

Metallkomplexe mit dualer Funktionalität:
Eine Studie über die zelluläre Wirkungsweise
photozytotoxischer Kinaseinhibitoren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Anja Ludewig, M. Sc.

aus Wiesbaden

Marburg/Lahn 2014

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Die vorliegende Dissertation entstand in der Zeit von Oktober 2010 bis Dezember 2013 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe und unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Eric Meggers.

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180)
als Dissertation am _____ angenommen.

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Eric Meggers

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Johann Heider

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2014

Danksagung

Mein erster Dank geht an Herrn Prof. Dr. Eric Meggers für die Betreuung während der letzten vier Jahre und für die Möglichkeit an einem Projekt arbeiten zu dürfen, das meine Begeisterung für die Forschung neu geweckt hat. Sowohl während meiner Dissertation, als auch meiner Masterarbeit waren Sie mir ein stets ansprechbarer Berater und ich bin sehr dankbar für die Unterstützung und das Vertrauen, das Sie mir bei der Durchführung dieser Arbeiten entgegengebracht haben.

Vielen Dank an Prof. Dr. Johann Heider für die Bereitschaft das Zweitgutachten für diese Arbeit zu übernehmen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei den Kooperationspartnern bedanken, die an dieser Arbeit mitgewirkt haben. Thank you Adina Vultur for the lively scientific exchange and the great melanoma cell pictures. Vielen Dank auch an Anna Lena Merkel, die ihre Zeit geopfert hat, um mit mir einige Nachmittage lang Zellen durch das FACS-Gerät zu jagen. Ohne dich wäre diese Arbeit um einige Erkenntnisse ärmer. Die in dieser Arbeit gezeigten Lokalisationsexperimente wären nicht möglich gewesen ohne Raimo Hartmann und seine Ausdauer auf der Suche nach den optimalen Versuchsbedingungen. Vielen Dank dafür. Und zuletzt auch Danke an meine Schwester Lena Kastl, die mich bei den morphologischen Zellstudien unterstützt hat.

Vielen Dank an Ina Pinnschmidt und Andrea Tschirch, die mir bei allen organisatorischen Dingen (insbesondere komplizierten Reisekostenabrechnungen) immer eine schnelle Hilfe waren.

Ich danke meinen fleißigen Korrekturlesern Elisabeth Martin, Patrick Szabo und Manuel Streib, dass sie trotz zahlreicher eigener Aufgaben die Zeit gefunden haben meine Arbeit anzuschauen.

Im Speziellen möchte ich mich auch noch einmal bei Katja Kräling und Elisabeth Martin bedanken, die des Öfteren für mich eingesprungen sind und sich um meine Zellen gekümmert haben, wenn ich nicht im Labor sein konnte.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine drei Synthesegötter Alexander Wilbuer, Sandra Dieckmann und Kathrin Wähler ohne die dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mit euch zusammen zu arbeiten hat mir großen Spaß gemacht und war eine tolle Erfahrung. Alex, mit dir hat dieses ganze Projekt angefangen und ich erinnere mich gerne daran zurück, wie wir gemeinsam versucht haben den Geheimnissen der Photozytotoxizität auf die Spur zu kommen. Sandra, unsere Zusammenarbeit hat nicht nur wissenschaftliche Erfolge hervorgebracht, sondern auch zu einer Freundschaft und vielen unvergessenen Erlebnissen geführt. Und mit dir Kathrin konnte diese Arbeit letztendlich zu

einem erfolgreichen Ende gebracht werden. Ich werde dich als Projektpartnerin und Tischnachbarin sehr vermissen.

Ebenfalls nicht möglich gewesen wäre diese Arbeit ohne Katja Kräling. Nicht nur, dass Du für jedes Problem im Labor eine Lösung weißt, Du warst mir auch immer eine große Stütze, wenn mal wieder alles schief zu gehen drohte und ich die Doktorarbeit am liebsten an den Nagel gehängt hätte. Ein großes Dankeschön dafür.

Zum Schluss möchte ich dem gesamten Arbeitskreis Meggers und auch seinen ehemaligen Mitgliedern danken, für vier unvergessliche Jahre. Ihr alle habt durch eure Hilfsbereitschaft, den außergewöhnlichen Zusammenhalt und das gute Arbeitsklima dazu beigetragen, dass diese Arbeit gelingen konnte.

Der letzte Dank geht an meine Familie und meinen Mann Peter. Viele Dinge sind nur möglich, wenn man Menschen hinter sich weiß, die immer für einen da sind. Danke für eure großartige Unterstützung während der letzten Jahre und die Kraft, die ihr mir gegeben habt, um das hier zu schaffen.

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden in Fachzeitschriften veröffentlicht oder auf Konferenzen in Form von Posterbeiträgen vorgestellt.

Veröffentlichte Artikel

- **A. Kastl**, A. Wilbuer, A. L. Merkel, L. Feng, P. Di Fazio, M. Ocker, E. Meggers, Dual Anticancer Activity in a Single Compound: Visible-Light-Induced Apoptosis by an Antiangiogenic Iridium Complex, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 1863–1865.
- **A. Kastl**, S. Dieckmann, K. Wähler, T. Völker, L. Kastl, A. L. Merkel, A. Vultur, B. Shannan, K. Harms, M. Ocker, W. J. Parak, E. Meggers, Rhenium Complexes with Visible-Light-Induced Anticancer Activity, *ChemMedChem.* **2013**, 8, 924-927.
- K. Wähler, **A. Ludewig**, P. Szabo, K. Harms, E. Meggers, Rhenium Complexes with Red-Light-Induced Anticancer Activity, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, 807-811.

Posterbeiträge

- **A. Kastl**, A. Wilbuer, E. Meggers, Killing Cancer Cells with Visible Light – Photoactive Iridium Kinase Inhibitors, *Frontiers in Medicinal Chemistry*, Saarbrücken, März 2011
- **A. Kastl**, S. Dieckmann, K. Wähler, E. Meggers, Fighting Cancer with Visible Light – New Applications for Metal Complexes in Photoactivated Cancer Therapy, *22nd International Symposium on Medicinal Chemistry*, Berlin, September 2012
- K. Wähler, **A. Ludewig**, P. Szabo, E. Meggers, Rhenium Complexes as Agents in Photo-activated Cancer Therapy, *ICBIC 2013*, Grenoble, Juli 2013

Abstract

Light as a therapeutic instrument is common since the ancient Egyptians and it is still a promising approach to attain the site-specific activation of chemotherapeutics in modern cancer therapy. Especially the photodynamic therapy, which is based on the cytotoxic effect of a light-activated singlet oxygen producer, has become a promising alternative for selective cancer treatment.

This work examines the photocytotoxic properties of organometallic iridium and rhenium complexes, in order to determine their potential as novel photodynamic agents. As essential requirement both kinds of metal complexes exhibit a strong antiproliferative effect on different cancer cell lines, after the irradiation with visible light. This is the result of several cell viability studies with complex concentrations in the nanomolar range. By contrast there is no toxic effect in the dark under these conditions. Similar to clinically approved photosensitizers, the here introduced complexes exhibit a cellular reaction within minutes after irradiation, which is accompanied by several typical apoptotic phenomena like cell shrinking, bleb formation, loss of adhesion and caspase activation. 24 h after irradiation the fragmentation of the DNA can be observed too. Especially the detailed analysis of the caspase activation led to the conclusion, that the irradiated complexes initiate the intrinsic apoptotic signaling pathway. Elicitor of this photocytotoxic effect is the generation of singlet oxygen, which could be determined under irradiated conditions in a cell-free detection-assay. This formation of reactive species is another elementary feature that the complexes share with common photosensitizers. However, a detail which makes them special and distinguishes them from other photoactive compounds is their additional function as kinase inhibitors. This property is based on the particular design of the pyridocarbazole ligand, which is a part of all examined complexes. This structure is inspired by the natural kinase inhibitor staurosporine and enables the complexes to bind in the active site of this protein class. Supported by the other coordinated ligands the herein presented iridium complex AW0234 represents a selective inhibitor for the receptor tyrosine kinase VEGFR and shows a significant antiangiogenic effect in three-dimensional endothelial spheroids. For the rhenium complexes it was possible to detect a nanomolar inhibition of the cytosolic protein kinase Pim1, which is also well-known for its implication in different tumor diseases. Consequently the complexes demonstrated in this work represent potential therapeutic agents with a dual anti-cancer activity that combines the advantages of the photodynamic therapy with the inhibition of protein kinases.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Entstehung der modernen Krebstherapie.....	1
1.2	Herausforderungen und Lösungsansätze der modernen Krebstherapie.....	3
1.3	Photodynamische Therapie.....	9
1.3.1	Photophysik und Photochemie der Photodynamischen Therapie.....	9
1.3.2	Photosensibilisatoren.....	13
1.3.3	Wirkung der PDT im Tumorgewebe.....	20
1.4	Metalle in medizinischen und phototherapeutischen Anwendungen.....	24
2	Aufgabenstellung.....	29
3	Ergebnisse und Diskussion	33
3.1	Metallkomplexe mit photozytotoxischen Eigenschaften.....	33
3.2	Photochemische und zelluläre Ursachen des photozytotoxischen Effekts.....	39
3.3	Untersuchung des Zelltods infolge der photodynamischen Behandlung mit SEK030	47
3.4	Struktur-Aktivitäts-Beziehung und Optimierung von SEK030.....	56
3.5	Kinase-inhibierende Eigenschaften der Photosensibilisatoren.....	67
4	Zusammenfassung und Ausblick	77
5	Experimentalteil	87
5.1	Geräte und Materialien.....	87
5.1.1	Geräte.....	87
5.1.2	Puffer und Chemikalien.....	88
5.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	89
5.1.4	Metallkomplexe.....	89
5.2	Methoden.....	90
5.2.1	Zellkultivierung.....	90
5.2.2	Belichtungsaufbau.....	93
5.2.3	Nachweis photoinduzierter Zytotoxizität.....	95
5.2.4	Echtzeit-Zellviabilitäts-Analyse.....	98

5.2.5	Fluoreszenzfärbungen	99
5.2.6	Intrazelluläre Detektion reaktiver Sauerstoffspezies	99
5.2.7	Zellzyklusanalyse	101
5.2.8	Nachweis der Caspase-Aktivität	102
5.2.9	Messung von Veränderungen im mitochondrialen Membranpotential	104
5.2.10	3D-Angiogenese Test	105
5.2.11	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	106
5.2.12	Nicht selbstständig durchgeführte Arbeiten	108
Literaturverzeichnis		113
Abkürzungsverzeichnis		123
Strukturverzeichnis		129
Anhang		133
Zellviabilitäts-Tests		133
xCELLigence-Messungen		139
Singulett Sauerstoff Nachweis		142
Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies		144
Nachweis aktiver Caspasen		145
IC ₅₀ -Bestimmung		146
Spektren der eingesetzten Lampen		147
Wissenschaftlicher Werdegang		Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

1.1 Entstehung der modernen Krebstherapie

Als „einen weißen Panzer aus schlecht durchblutetem Gewebe, der sich wie eine Krabbe im Sand in das Fleisch eingräbt“ beschrieb HIPPOKRATES 400 Jahre vor Christus das Leiden seiner Patienten und prägte damit den Namen, den diese Krankheit bis heute trägt: Krebs. Bereits zu der damaligen Zeit beschäftigten sich Gelehrte mit den Ursachen dieser Erkrankung und versuchten sie mit Medikamenten wie Arsen, Schwefel, Cantharis und Helleborus (Nieswurz) zu behandeln. Der heute gebräuchliche Begriff der Chemotherapie wurde jedoch erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts im Zusammenhang mit den Arbeiten von PAUL EHRLICH zur Behandlung von Infektionserkrankungen eingeführt. Der Beginn der Chemotherapie in der Krebsmedizin liegt in den 1940er Jahren. Damals griffen Forscher der *Yale School of Medicine* Beobachtungen aus den Senfgas-Kampfeinsätzen des ersten Weltkriegs auf, bei denen Knochenmarksdepressionen und die Rückbildung lymphatischen Gewebes an gefallen Soldaten festgestellt worden waren (Abbildung 1).^[1,2] Inspiriert von diesen Erkenntnissen begannen LOUIS GOODMAN und ALFRED GILMAN mit der Untersuchung von Schwefel- und Stickstoffloten in Bezug auf ihren therapeutischen Effekt in Lymphomen.^[3] Bereits 1942 konnten sie den Chirurgen GUSTAV LINDBERGH von einem ersten klinischen Test mit dem Stickstofflost Tris(2-chloroethyl)amin in einem Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom überzeugen.^[4] Der Versuch verlief zunächst mit großem Erfolg und führte innerhalb weniger Tage zu einer beachtlichen Regression der Tumore. Zwar hielt dieser Effekt nur für einige Wochen an, bis ein erneutes Tumorwachstum einsetzte, trotzdem war der gewünschte Beweis erbracht. Zum ersten Mal in der Geschichte konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, eine Tumorrückbildung durch den systematischen Einsatz eines Medikaments hervorzurufen. Der eigentliche Wirkungsmechanismus des Medikaments wurde erst in späteren Studien geklärt. Dabei entsteht ausgehend von dem Tris(2-chloroethyl)amin zunächst ein Ethylenammoniumring, der als alkylierendes Intermediat mit den Purinbasen der DNA reagiert und zu einer Verknüpfung der beiden DNA-Stränge führt.^[5,6]

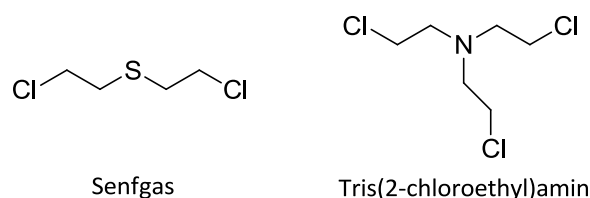


Abbildung 1: Bereits im ersten Weltkrieg wurde die Beobachtung gemacht, dass Senfgas zu Knochenmarksdepressionen und einer Rückbildung des lymphatischen Gewebes bei Soldaten führt. Das von dieser Struktur abgeleitete Tris(2-chloroethyl)amin wurde später zum ersten gezielt entwickelten Wirkstoff gegen Krebs.

Ein Prinzip, dass später auch für zahlreiche weitere Krebsmedikamente übernommen wurde, die heute als Gruppe der alkylierenden Chemotherapeutika bekannt sind. Zu ihnen zählen unter anderem die Verbindungen Cyclophosphamin (Endoxan), Chlorambucil (Leukeran), Mitomycin C^[7] und Cisplatin^[8]. Ein weiteres Prinzip der Krebstherapie, das Ende der 1940er entdeckt wurde, ist das der Anwendung von Antimetaboliten. Erste Erfolge erzielten hier SYDNEY FARBER und HARRIETT KILTE mit der Entwicklung des Folsäure-Analoges Methotrexat zur Behandlung akuter lymphatischer Leukämie.^[2,9] Das bis heute eingesetzte Medikament inhibiert die Dihydrofolatreduktase^[10], ein Enzym, das entscheidend an der Aktivierung des Vitamins und dem folgenden Prozess der Nukleotid-Biosynthese beteiligt ist. Ebenfalls in die DNA-Synthese eingegriffen wird durch den Einsatz von Purin-Analogen wie dem 1954 veröffentlichten 6-Mercaptopurin^[11,12], welches Ausgangspunkt für eine Reihe von Thiopurinen in der Krebstherapie war.

Nach der anfänglichen Euphorie und den ersten Erfolgen der neuen Medikamente geriet die Chemotherapie bereits nach wenigen Jahren wieder in Verruf. Schuld daran waren die häufig nur kurz andauernden Verbesserungen der Leiden, die geringe Aussicht auf Heilung und die enormen Nebenwirkungen, die den Patienten mehr Leid als Nutzen brachten. Dies führte Anfang der 60er Jahre zu einem Umdenken in der Behandlungsweise. Anstatt der bisherigen Palliativtherapie wurde das Ziel nun auf vollständige Heilung ausgerichtet. Dabei wurde auf frühere Arbeiten von JACOB FURTH und MORTON KAHN zurückgegriffen, die gezeigt hatten, dass eine einzelne implantierte Blutkrebszelle dazu in der Lage ist, den Tod einer Maus hervorzurufen.^[13]

Aus dieser Erkenntnis schloss HOWARD SKIPPER vom *Southern Research Institute*, dass eine vollständige Heilung der Krankheit nur dann möglich ist, wenn auch die letzte entartete Zelle aus dem Organismus entfernt wurde. Als Konsequenz wurden die Dosen der eingesetzten Medikamente erhöht und die Idee der kombinierten Chemotherapie entwickelt.^[2] Erste klinische Erfolge fanden mit dem VAMP-Programm statt, einer Kombination aus Vincristin (Vincaalkaloid), Amethopterin (Methotrexat), 6-Mercaptopurin und Prednison (Immunsuppressivum). Mit dieser Strategie war es erstmals möglich, eine für mindesten ein Jahr andauernde Rückbildung des Tumorgewebes, bei 50 % der an akuter lymphatischer Leukämie erkrankten Kinder, zu erreichen.^[2] Eine weitere Kombination mit dem Namen MOPP (Stickstofflost, Vincristin, Procarbazin und Prednison) erzielte ähnliche Erfolge bei der Behandlung des Hodgkin-Lymphoms. Die Rate an vollständiger Rückbildung der Tumore stieg von null auf 80 %, wovon 47 % der Patienten nie wieder einen Rückfall erlitten.^[14] Die Erkenntnis, dass Krebs durch Medikamente heilbar ist, war ein weiterer Meilenstein in der Erforschung dieser Krankheit und führte dazu, dass die Onkologie 1973 offiziell als Teilgebiet der inneren Medizin anerkannt wurde.

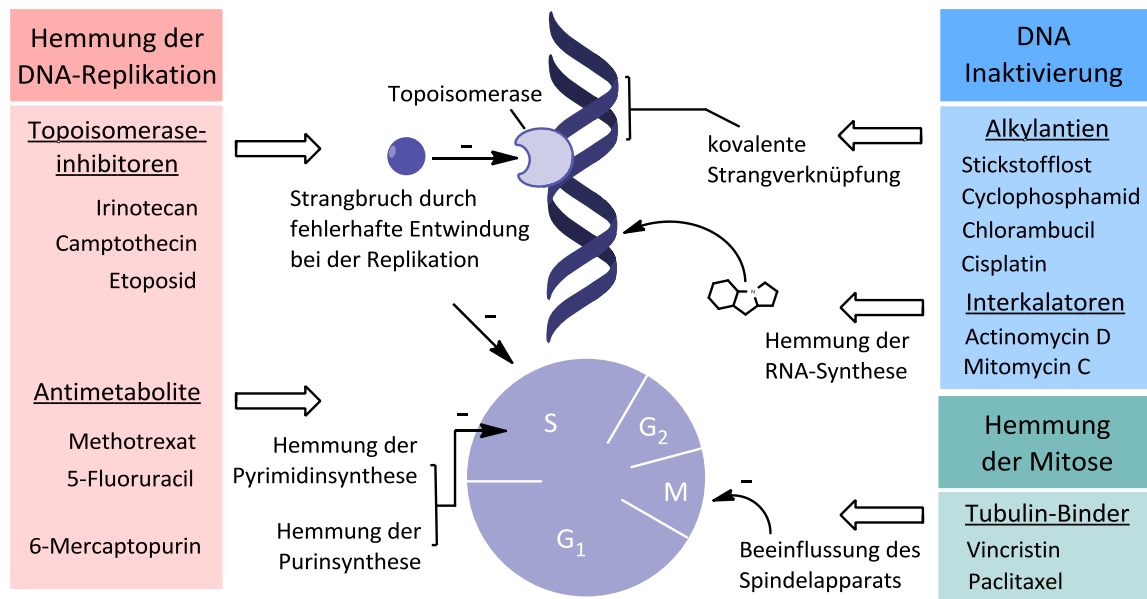


Abbildung 2: Chemotherapeutische Ansätze der Krebs therapie zwischen 1950 und 2000.

Auch in den folgenden Jahren wurde die Suche nach neuen Wirkstoffen fortgesetzt. Zu dieser Zeit setzten viele Forscher auf die Extraktion von Naturstoffen aus dem Pflanzenreich und ihre Untersuchung auf eine antikarzinogene Wirkung. Dieser Ansatz führte 1964 zur Entdeckung der Taxane und der späteren Entwicklung des sehr erfolgreichen Wirkstoffs Paclitaxel.^[15] Aber auch wenn einzelne Erfolge wie dieser immer wieder verbucht werden konnten, täuschte dies nicht über die Tatsache hinweg, dass die Krebsforschung in einer Krise steckte. Die Anzahl neu zugelassener Medikamente nahm stetig ab und diejenigen Wirkstoffe, die es bis zu einer klinischen Anwendung brachten, funktionierten nach den bereits bekannten Prinzipien als Antimetabolite, Alkylantien, Mitose- oder Topoisomeraseinhibitoren (Abbildung 2).^[16] Folglich konnte auch keines der schwerwiegenden Probleme der Chemotherapie, wie die unzureichende Selektivität der Wirkstoffe für entartete Zellen, die damit verbundenen starken Nebenwirkungen oder die hohe Anzahl an Resistenzfällen, gelöst werden. Der Übergang in das neue Jahrtausend war somit auch mit einem Neuanfang und einem Umdenken in der Krebs therapie verbunden.

1.2 Herausforderungen und Lösungsansätze der modernen Krebs therapie

Die Voraussetzungen für den eingeläuteten Wandel in der Krebs therapie wurden bereits mit der intensiven Grundlagenforschung in den 70er und 80er Jahre geschaffen. Neue molekularbiologische Techniken, wie die DNA-Sequenzierung^[17] und das molekulare Klonen, führten zu neuen Erkenntnissen über die Ursachen und den Verlauf von Tumorerkrankungen. 1976 veröffentlichten HAROLD VARMUS und J. MICHAEL BISHOP ihre ersten Arbeiten über das aus dem Avian Sarcoma Virus isolierte *src* Gen. Frühere Arbeiten hatten bereits gezeigt, dass dieses Virus

für das Auftreten und die Weitergabe eines bestimmten Typs von Sarkomen bei Hühnern ausschlaggebend ist.^[18] Mit dem *src* Gen konnte nun erstmals eine ganz bestimmte Nukleotidsequenz als Auslöser für die Tumorbildung verantwortlich gemacht werden.^[19] Dabei stellte sich heraus, dass es sich bei *src* nicht um ein virusspezifisches Gen handelt, sondern, dass eng verwandte DNA-Sequenzen auch in zahlreichen nicht infizierten Vertebratengenomen vorhanden sind.^[20,21] Damit stand fest, dass es sich bei *src* um ein ursprünglich zelluläres Gen handelt, das erst im Zuge einer Infektion in das Virusgenom integriert wurde. Ein weiterer entscheidender Schritt für die Aufklärung des onkogenen Effekts war die Identifizierung der Tyrosinkinase pp60^{src} als entsprechend zugehöriges Protein des *src* Gens.^[22,23] Passend zu dieser Erkenntnis konnten HUNTER *et al.* zeigen, dass die Anzahl an phosphorylierten Tyrosinresten in virustransformierten Zellen achtmal so hoch ist, wie in nicht infizierten Kontrollzellen, die nur die normale zelluläre Version des Gens trugen.^[24] Dies brachte den Hinweis, dass die onkogene Wirkung des *src* Gens nicht auf dem alleinigen Vorhandensein des Gens beruht, sondern durch eine Steigerung seiner Aktivität hervorgerufen wird. Dieses Prinzip wurde in den darauffolgenden Jahren anhand einer großen Anzahl weiterer entdeckter Tumorgene bestätigt, die unter dem Begriff der Onkogene zusammengefasst wurden. Onkogene sind laut Definition Gene, die den Übergang vom normalen Proliferationsverhalten einer Zelle zu unkontrolliertem Wachstum fördern. Dabei ist der Zwischenschritt über die Integration in ein Virusgenom nur in seltenen Fällen der Grund für ihre Entstehung. 1979 konnten WEINBERG *et al.* mit ihren Versuchen an Mausfibroblasten zeigen, dass auch eine durch Mutationen veränderte Nukleotidsequenz der Auslöser für einen malignen Phänotyp sein kann. Hierzu behandelten sie aus Mäusen und Ratten isolierte Zellen mit karzinogenen Substanzen und leiteten daraus 15 verschiedene transformierte Zelllinien ab. Anschließend transfizierten sie nicht maligne NIH3T3-Zellen mit DNA dieser Zelllinien, was in fünf der 15 Fälle zu einem Auftreten des transformierten Phänotyps in den Empfängerzellen führte. DNA aus normalen Zellen zeigte diese Eigenschaft nicht.^[25]

Heute ist bekannt, dass jeder Krebserkrankung eine Veränderung der DNA einzelner Zellen zugrunde liegt. Diese Veränderung kann durch äußere Einflüsse wie karzinogene Substanzen, ionisierende Strahlung oder Tumorstoffe verursacht werden, aber auch durch Fehler während der DNA-Replikation und der sich anschließenden Zellteilung entstehen. Entscheidend für die Tumorgenese ist, dass die entstandenen DNA-Schäden zur Entstehung von Onkogenen führen und dem entsprechend einen Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus ausüben (Abbildung 3). Bekannte Beispiele sind hierbei Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, wie der in 25-30% aller Brustkrebserkrankungen überexprimierte Rezeptor HER2.

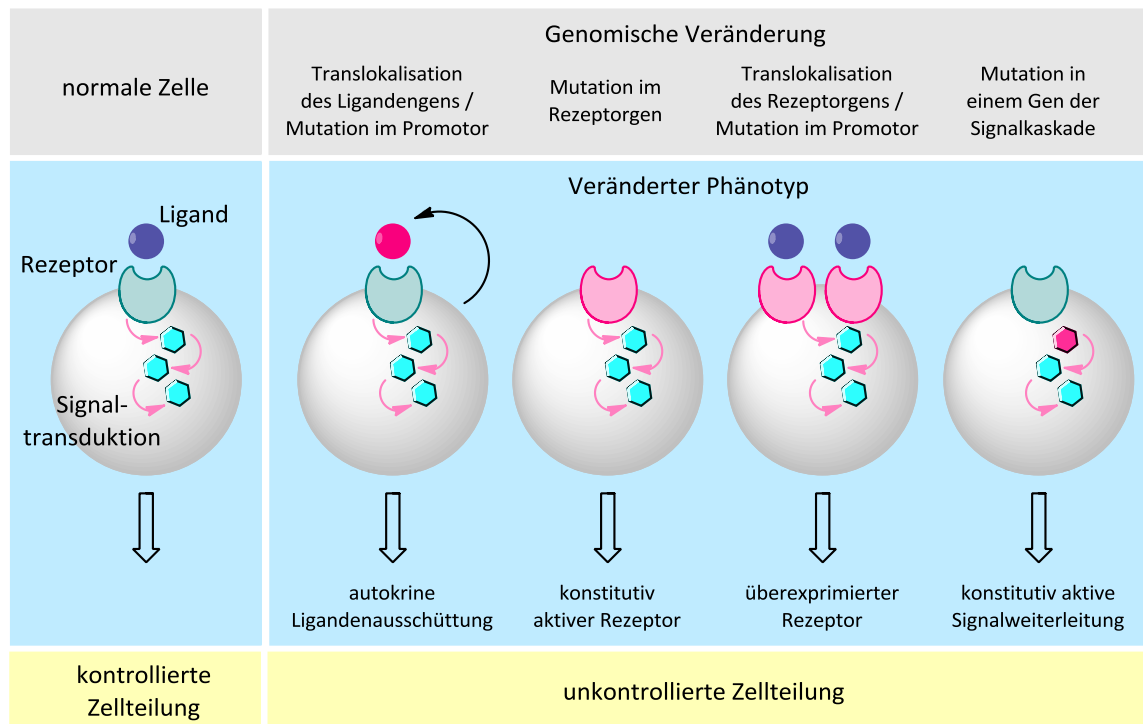


Abbildung 3: Onkogene Veränderungen im Genom einer Zelle und die daraus resultierenden Folgen für die Regulation des Zellwachstums.

In seiner normalen Funktion bindet der Rezeptor den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und übermitteln der Zelle auf diesem Weg die Erlaubnis zur Teilung. Bei einigen Brustkrebszellen ist die Anzahl der Rezeptoren allerdings um mehr als das 20-fache des Normalwertes erhöht. Diese Zellen reagieren dadurch bereits auf geringste Mengen an EGF in ihrer Umgebung und entziehen sich damit dem regulierenden Effekt durch diesen Wachstumsfaktor.^[26] Ein weiteres Beispiel ist die Serin/Threonin-Kinase B-Raf, die als Mitglied des RAS-RAF-MEK-ERK Signalwegs an der Weiterleitung von Wachstumssignalen in der Zelle beteiligt ist. Wie gezeigt werden konnte ist das Gen dieser Kinase in 66 % aller bösartigen Melanome mutiert. Dabei ist eine einzelne Punktmutation in der Kinasedomäne ausreichend, um das Protein in eine daueraktive Form zu wandeln und damit ein ununterbrochen positives Wachstumssignal zu erzeugen.^[27]

Dies sind nur zwei Beispiele einer Vielzahl heute bekannter Onkogene. Wie man mittlerweile weiß, ist ihr alleiniges Auftreten jedoch nicht ausreichend für die Entstehung einer Krebserkrankung. In der intakten Zelle besitzen Onkogene einen Gegenspieler. Diese so genannten Tumorsuppressor-Gene verfügen über eine Kontrollfunktion an entscheidenden Stellen des Zellzyklus und sind in der Lage diesen zu stoppen, wenn massive Schäden in der DNA vorliegen. Für Tumorsuppressor-Gene gilt daher der umgekehrte Schluss wie für Onkogene: Erst eine Mutation, die zu ihrer Inaktivierung führt, ermöglicht den Tumorzellen ein unkontrolliertes Wachstum. Eine breite Anzahl an Forschern unterstützt heute die Theorie, dass die Entstehung

von Krebs ein mehrstufiger Prozess ist, dem eine Reihe von genomischen Veränderungen zugrunde liegen, die sowohl die Entstehung von Onkogenen, als auch die Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen einschließen. Das Resultat ist eine Zelle, die unabhängig von extrazellulären Wachstumssignalen ist, insensitiv gegenüber Wachstums-inhibierenden Signalen, den programmierten Zelltod umgeht, ein uneingeschränktes Wachstumspotential besitzt sowie die Fähigkeit zur Angiogenese und der Invasion in umliegendes Gewebe hat.^[28] Nur eine Zelle, die all diese Eigenschaften aufgrund von Mutationen erworben hat, besitzt das Potential eine bösartige Tumorerkrankung zu verursachen.

Dieses Wissen ermöglichte eine völlig neue Herangehensweise an die Behandlung von entarteten Zellen. Anstatt des bisherigen Ansatzes der zytotoxischen Chemotherapie, der hauptsächlich auf ein Eingreifen in die DNA-Replikation ausgerichtet war, gingen Krebsforscher nun dazu über Medikamente mit selektiver Wirkung gegen im Tumorgewebe veränderte Proteine zu entwickeln (Abbildung 4).

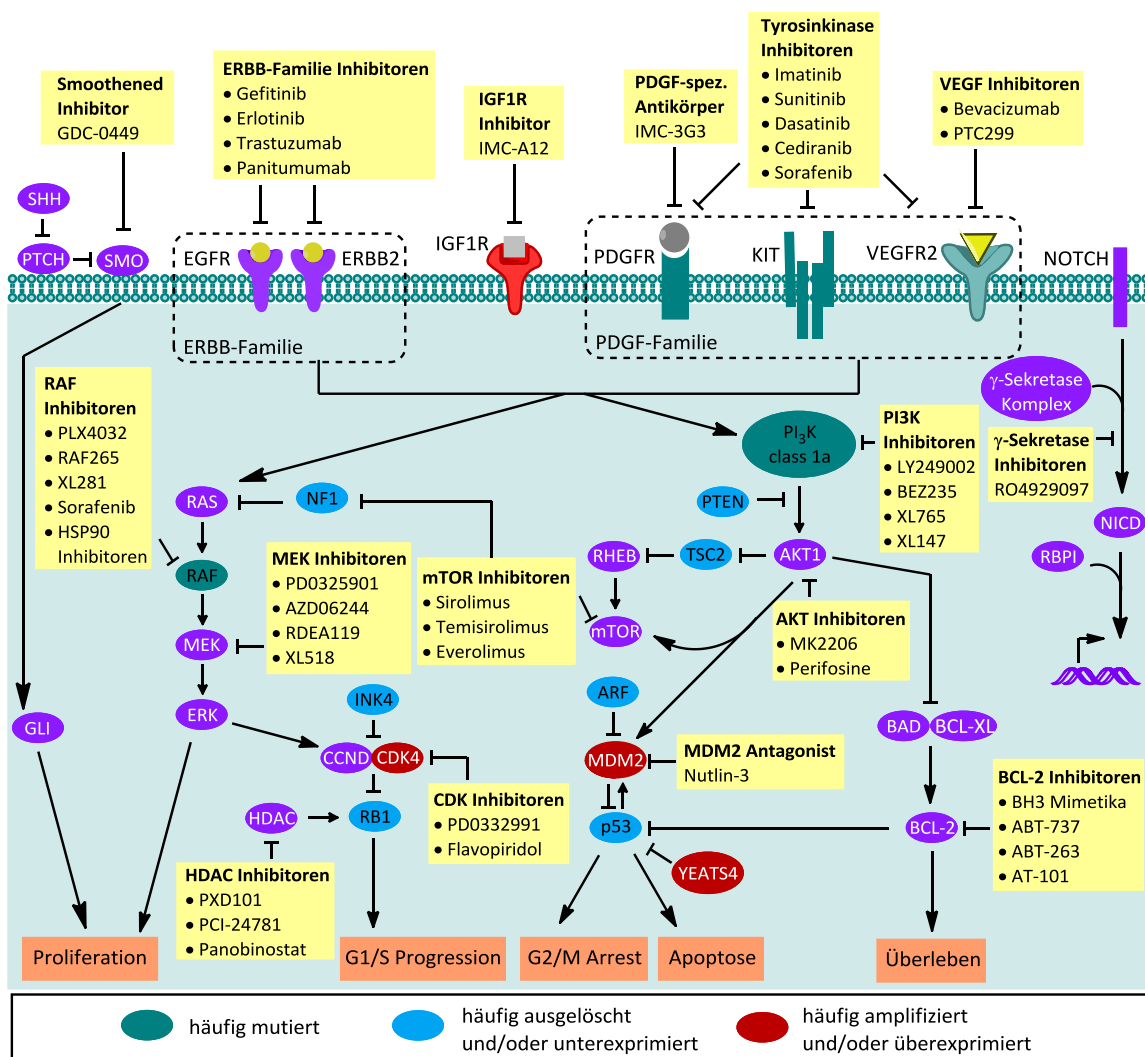


Abbildung 4: Übersicht häufig veränderter Signalwege in Krebszellen und die zu ihrer Regulierung entwickelten Inhibitoren der zielgerichteten Krebstherapie.^[29]

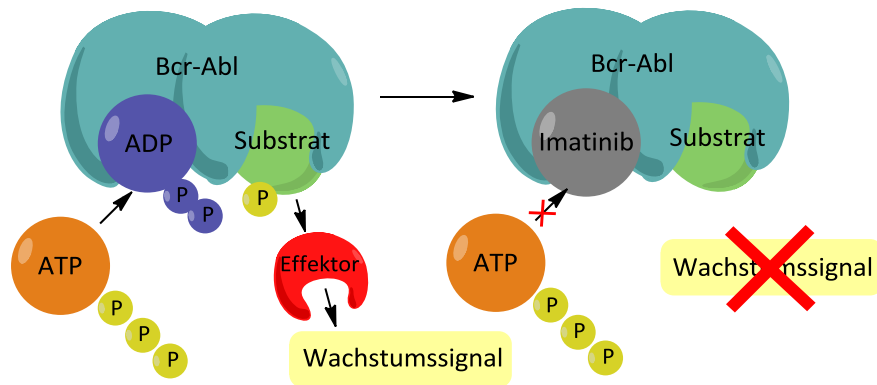


Abbildung 5: Wirkungsmechanismus des ersten zugelassenen Kinaseinhibitors für die Krebstherapie Imatinib.

Als eines der potentesten Angriffsziele erwiesen sich dabei Proteinkinasen, die aufgrund ihrer vielfältigen Funktion bei der Regulation des Zellwachstums auch als Onkogene eine große Rolle spielen. Der erste Erfolg dieser zielgerichteten Krebstherapie (engl. *Targeted Therapy*) war der 2001 zugelassene Wirkstoff Imatinib. Er inhibiert die Bcr-Abl Tyrosinkinase, ein Protein, das aus der Fusion des *bcr*-Gens auf Chromosom 22 und dem *abl* Gen auf Chromosom 9 entsteht.^[30] Diese fehlerhafte Genkombination liegt in 95% aller Fälle von chronischer myeloischer Leukämie (CML) vor und führt zu einer gesteigerten Aktivität der Abl-Kinase.^[31] Imatinib blockiert die ATP-Bindestelle dieser Kinase und unterbindet damit ihre Funktion bei der Weiterleitung zellulärer Wachstumssignale (Abbildung 5).^[32] Dieser Therapieansatz führte zu einem großen Fortschritt in der Behandlung von CML und Imatinib wurde zum Aushängeschild der zielgerichteten Krebstherapie. Es folgten zahlreiche weitere Zulassungen von Proteinkinaseinhibitoren für die Behandlung eines breiten Spektrums an Krebserkrankungen. Trotzdem konnte kaum einer der neuen Wirkstoffe an die Erfolge von Imatinib anknüpfen. Das liegt mitunter daran, dass in den wenigsten Fällen eine so ausgeprägte Korrelation zwischen einem mutierten Gen und der Entstehung einer Tumorerkrankung besteht, wie zwischen dem *bcr-abl* Gen und CML. Dies zeigen unter anderem die Erfahrungen mit dem EGFR-Inhibitor Gefitinib bei der Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms. Die ursprüngliche Begründung für den Einsatz dieses Medikaments waren Studien, die auf eine Überexpression von EGFR in 45 % der Krankheitsfälle hinwiesen.^[33] Trotzdem zeigten in einer späteren Phase II-Studie nur 19 % der Patienten eine positive Reaktion auf den Wirkstoff.^[34] Wie sich in weitergehenden Untersuchungen herausstellte, steht die erfolgreiche Behandlung mit Gefitinib in einem direkten Zusammenhang mit einer aktivierenden Punktmutationen im Gen des EGFR-Rezeptors.^[35] Das bedeutet, dass die Therapie nur für einen ausgewählten Patientenkreis mit genau diesem Gendefekt die gewünschte Tumorregression erzielt. Noch schwieriger wird die Behandlung, wenn nicht nur eine, sondern mehrere Fehlregulationen ausschlaggebend für das Wachstumsverhalten eines

Tumors sind, wie es bei den meisten Krebserkrankungen der Fall ist. Hier erzielt der Einsatz eines einzelnen zielgerichteten Inhibitors oft nur eine geringe bis gar keine Wirkung. Hinzu kommt, dass entartete Zellen aufgrund ihrer genetischen Instabilität dazu in der Lage sind, die Wirkung eines Inhibitors sehr schnell zu umgehen und eine Resistenz zu entwickeln. Dies konnte bereits in den frühen Studien zu Imatinib beobachtet werden. Patienten in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium der CML zeigten trotz der Behandlung mit Imatinib eine erneute Zunahme an malignen Zellen. Der Grund hierfür war eine Reaktivierung des Bcr-Abl Signalwegs. Wie sich herausstellte, führte in sechs von neun Fällen der Austausch eines für die Inhibitorbindung entscheidenden Threonin-Rests in der Kinase Domäne gegen ein Isoleucin zur erworbenen Resistenz gegen den Wirkstoff.^[36] Die gewonnene Erkenntnis aus den Erfahrungen mit niedermolekularen Inhibitoren oder auch monoklonalen Antikörpern, die ebenfalls in der zielgerichteten Therapie eingesetzt werden, ist, dass jeder Tumor seinen eigenen individuellen Genotyp besitzt. Diese Tatsache macht eine gezielte Behandlung schwierig, aber nicht unmöglich. Es setzt voraus das Mutationsprofil des Tumors vor seiner Behandlung genau zu kennen und die Therapie mit einem oder mehreren Wirkstoffen gezielt darauf anzupassen. Viele der heute zugelassenen Kinaseinhibitoren werden kombiniert eingesetzt, wie zum Beispiel Gefitinib und Sunitinib bei Nierenkrebs oder auch Gefitinib in Kombination mit klassischen Chemotherapeutika wie Fluoruracil und Oxaliplatin bei Darmkrebs.^[37] Diese Maßnahme erhöht die Chancen auf eine vollständige Tumorregression und senkt gleichzeitig das Risiko einer Resistenz. Neben der zielgerichteten Therapie wird stetig auch nach weiteren Lösungsansätzen einer selektiven Tumorbehandlung gesucht. Eine Möglichkeit bieten hier die während des letzten Jahrzehnts intensiv untersuchten Nanotherapeutika, die in Form von Partikeln, Kristallen, Gelen, Liposomen oder Micellen für den Transport von Chemotherapeutika erprobt werden. Dabei umschließt oder bindet das Vehikel den Wirkstoff und befördert ihn so in einer inaktiven Form zu den Tumorzellen. Durch ein Adressmolekül, wie zum Beispiel einen gegen Tumoroberflächenproteine gerichteten Antikörper oder auch Liganden, die an überexprimierte Rezeptoren der Tumore binden, erkennt das Transportmolekül sein Zielgewebe und gibt seinen Wirkstoff dort selektiv frei.^[38] Zwar steckt diese Therapieform noch in den Anfängen, trotzdem gibt es bereits erste klinische Studien mit liposomal verpackten Chemotherapeutika wie Doxorubicin oder Vincristin, die ein auf diese Weise verringertes Auftreten von Nebenwirkungen untersuchen.^[39,40] Eine weitere Möglichkeit zur selektiven Behandlung von Krebserkrankungen ist die Aktivierung des Wirkstoffes im Tumorgewebe durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht. Auf den Ansatz mit dem bislang größten Erfolg, die Photodynamische Therapie (PDT), soll in den nächsten Abschnitten näher eingegangen werden.

1.3 Photodynamische Therapie

Der Einsatz von Licht als Therapiemittel war schon vor 3000 Jahren im alten Ägypten, Indien und China bekannt. Seine Geschichte in der Krebstherapie beginnt im 20. Jahrhundert. Im Jahr 1900 machte der damalige Medizinstudent OSCAR RAAB die Entdeckung, dass bestimmte Wellenlängen letal auf mit Acridin behandelte Mikroorganismen wirken.^[41] Nur drei Jahre später wurden im gleichen Labor erste Versuche mit dem Epilepsiemedikament Eosin, in Kombination mit der Bestrahlung durch weißes Licht, zur Behandlung von Hauttumoren durchgeführt.^[42] Der damalige Versuchsleiter Professor HERMANN VON TAPPEINER prägte dabei für seine Beobachtungen die Beschreibung der *photodynamischen Wirkung*. Der heute gebräuchliche Begriff der Photodynamischen Therapie charakterisiert die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in einem bestimmten Gewebe durch die lichtinduzierte Anregung eines photosensiblen Wirkstoffs (Photosensibilisator) (Abbildung 6). Dadurch grenzt er sich von weiter gefassten Begriffen wie der Photochemotherapie ab, die auch sauerstoffunabhängige Wirkungsmechanismen einschließt.^[43]

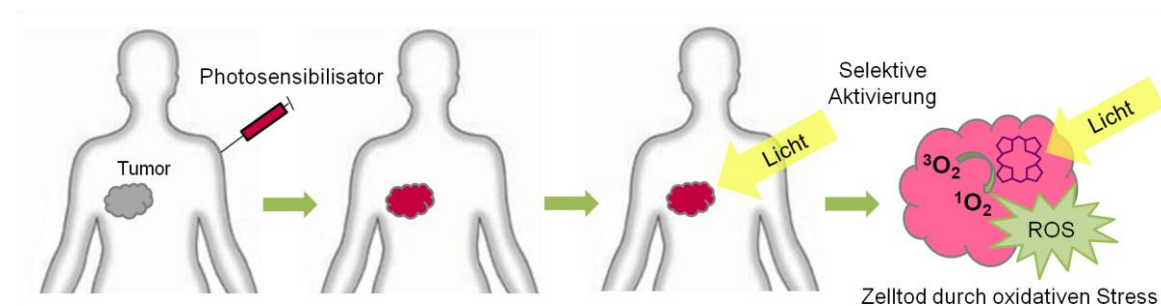


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung der Abläufe einer PDT.

1.3.1 Photophysik und Photochemie der Photodynamischen Therapie

Mit der Photochemie lassen sich die Wechselwirkungen zwischen den drei Grundeinheiten der Photodynamischen Therapie, Licht, Photosensibilisator (PS) und Sauerstoff, beschreiben. Vor Beginn der Bestrahlung liegt der Photosensibilisator zunächst in seiner energetisch günstigsten Variante, dem Grundzustand, vor. Dabei sind alle Elektronen gepaart (Singulett-Zustand) und auf die Orbitale mit den niedrigsten Energieniveaus verteilt. Durch die Absorption eines Photons verlässt eines der Elektronen den Grundzustand (S_0) und wird in ein unbesetztes Orbital eines höheren Energieniveaus (S_1 , S_2 , S_3 , ...) gehoben. Dieser Zustand ist energetisch ungünstig und daher nur von kurzer Dauer, bevor das Elektron auf seinen Ursprungslevel zurückfällt. Die anfängliche Anregungsenergie wird dabei als Wärme oder neues Photon mit höherer Wellenlänge (Fluoreszenz) wieder abgegeben (Abbildung 7).

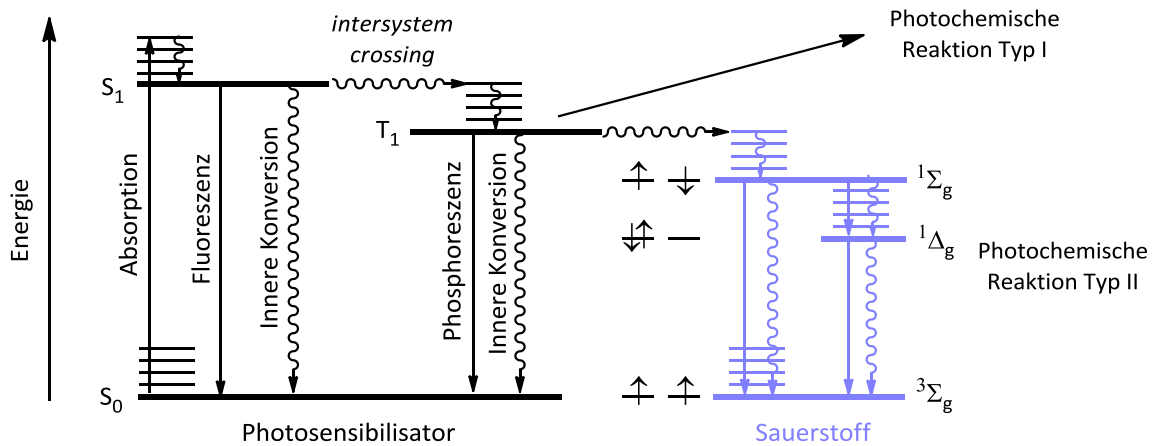
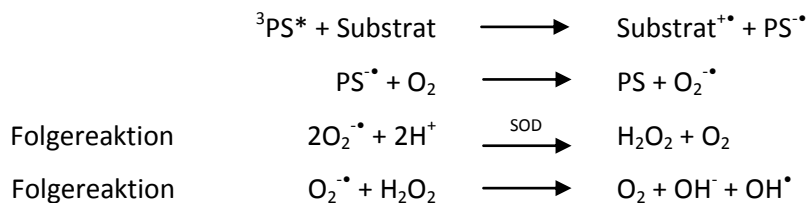


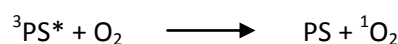
Abbildung 7: JABLONSKI-Diagramm der photochemischen Prozesse eines Photosensibilisators (S = Singulett-zustand, T = Triplett-Zustand).

Anstatt dieser direkten Rückkehr in den Grundzustand, erfolgt bei der Photodynamischen Therapie mit hoher Effizienz eine Überführung des Moleküls in den Triplett-Zustand (T_1). Bei diesem als *intersystem crossing* bezeichneten Vorgang wird der Spin des angeregten Elektrons umgekehrt, so dass dieser nun parallel zu dem des ursprünglichen Partnerelektrons ist. Auch aus diesem Zustand kann das Elektron unter erneuter Spinnumkehr auf das Grundniveau zurückfallen und dabei Wärme oder ein Photon (Phosphoreszenz) erzeugen. Allerdings begünstigt die längere Lebensdauer des T_1 -Zustands verglichen mit dem S_1 -Zustand, die Umwandlung der Energie des angeregten Elektrons in die Aktivierungsenergie weiterer photochemischer Reaktionen.^[44] Dies kann zum einen der Transfer von Elektronen oder Protonen von einem oder auf ein benachbartes Molekül sein (Typ-I photochemische Reaktion), oder zum anderen die Übertragung von reiner Energie auf Sauerstoff (Typ-II photochemische Reaktion). Im ersten Fall entstehen kationische oder anionische Radikale, die in weiteren Schritten mit molekularem Sauerstoff zu ROS reagieren. Im zweiten Fall führt der Energietransfer auf ein Sauerstoffmolekül (3O_2) zu dessen Überführung in den Singulett-Zustand (1O_2). Beide Prozesse finden in der PDT statt und erzeugen die entscheidenden zellschädigenden Spezies. Allerdings dominiert die Typ-II Reaktion bei den meisten Photosensibilisatoren.^[44–46]

Typ-I photochemische Reaktion:



Typ-II photochemische Reaktion:



Singulett Sauerstoff ist damit hauptverantwortlich für den toxischen Effekt, der während der PDT in den Tumorzellen erzeugt wird. Im Gegensatz zur normal vorliegenden Triplett-Form des Sauerstoffs, bei der die beiden antibindenden π^* -Orbitale mit jeweils einem Elektron des gleichen Spins besetzt sind, liegen die Elektronen beim Singulett Sauerstoff gepaart in einem π^* -Orbital mit entgegengesetzten Spins vor.^[47] Dieser Zustand ist energetisch ungünstiger und verleiht dem Molekül eine enorme Reaktivität, die zu oxidativen Schäden an sämtlichen zellulären Bestandteilen führen kann. Aufgrund seines ungeladenen Charakters, kann sich $^1\text{O}_2$ in der Zelle relativ frei bewegen und durch Membranen diffundieren. Allerdings wird sein Wirkungsbereich durch seine kurze Lebensdauer stark eingeschränkt. Diese beträgt in reinem Wasser etwa 3×10^{-6} s und wird in der Zelle durch die hohe Zahl an Reaktionspartnern noch auf 10^{-7} s verkürzt.^[48] Daraus ergibt sich ein maximaler Aktivitätsradius von ca. 30 nm, was in etwa dem Durchmesser eines Ribosoms entspricht.^[44,49] Aus dieser Tatsache wird deutlich, dass die Lokalisation des Photosensibilisators einen entscheidenden Einfluss auf seine zelluläre Wirkungsweise besitzt.

Für die Überführung eines normalen Sauerstoffmoleküls in seine Triplett-Form muss eine Energiedifferenz von 94.5 kJ/mol überwunden werden.^[44] Bei einer Anregung mit sichtbarem Licht im Bereich zwischen 620-690 nm werden etwa 170-190 kJ/mol auf den Photosensibilisator übertragen. Im Anschluss an das *intersystem crossing* sind weiterhin 110-130 kJ/mol dieser Energie im Triplett-Zustand der Verbindung enthalten. Genaue Berechnungen, unter Berücksichtigung thermischer Verluste, lassen darauf schließen, dass eine Generierung von $^1\text{O}_2$ bis zu einer maximalen Anregungswellenlänge von 850 nm möglich ist.^[44] Das untere Limit der Anregungswellenlänge wird durch Chromophore im menschlichen Gewebe bestimmt. Vor allem Wasser, Hämoglobin, Melanin und Cytochrome verhindern durch ihre Absorptionseigenschaften eine Ausnutzung des Lichtspektrums unterhalb einer Wellenlänge von 600 nm (Abbildung 8). Bei 630 nm, der Anregungswellenlänge des ersten zugelassenen Photosensibilisators Photofrin, dringt der Lichtstrahl dabei etwa 3-5 mm in das Tumorgewebe ein. Neuere Medikamente mit Anregungswellenlängen von mehr als 700 nm, lassen bereits Behandlungen mit der doppelten Eindringtiefe zu (Abbildung 8).^[44,50]

Zusammengefasst ergeben sich daraus folgende entscheidende Eigenschaften eines guten Photosensibilisators: Erstens eine starke Neigung zum *intersystem crossing* mit einer anschließenden möglichst langen Verweildauer im angeregten Triplett-Zustand, die zur Generierung von $^1\text{O}_2$ mit einer Quantenausbeute von mindestens 0.5 führt^[51]; zweitens eine Anregungswellenlänge innerhalb des optischen Fensters zwischen 600 und 850 nm sowie drittens eine strategisch günstige Lokalisation innerhalb der Zelle, die zu einer Schädigung an

den entscheidenden Positionen führt. Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Stabilität der Verbindung. Diese sollte für eine gewisse Zeit der intensiven Bestrahlung standhalten, um eine angemessene Behandlungsdauer zu gewährleisten. Auf der anderen Seite ist ihr biologischer Abbau eine Grundvoraussetzung, damit eine länger andauernde Photosensitivität des Patienten vermieden wird. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien, wurden im Laufe der letzten Jahrzehnte zahlreiche Verbindungen für die Photodynamische Therapie entwickelt und getestet. Einige von ihnen werden im nächsten Kapitel vorgestellt.

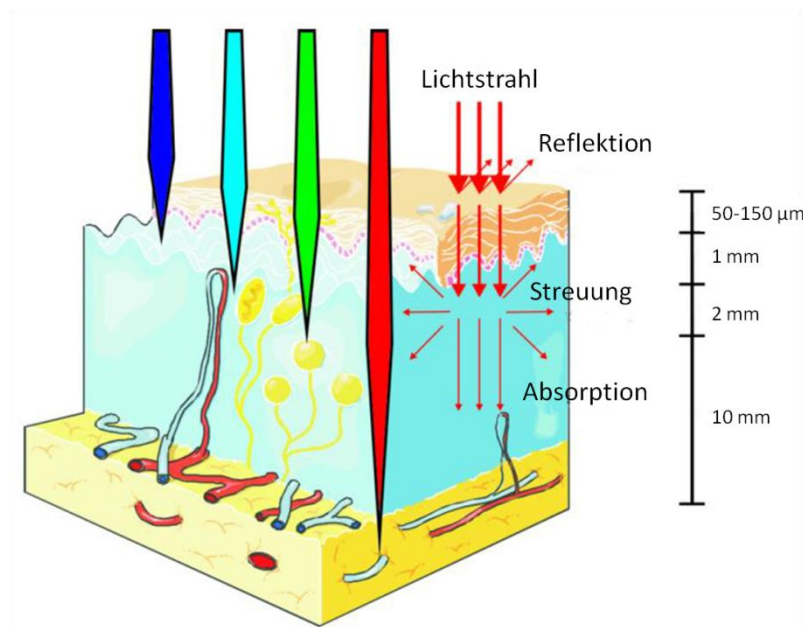
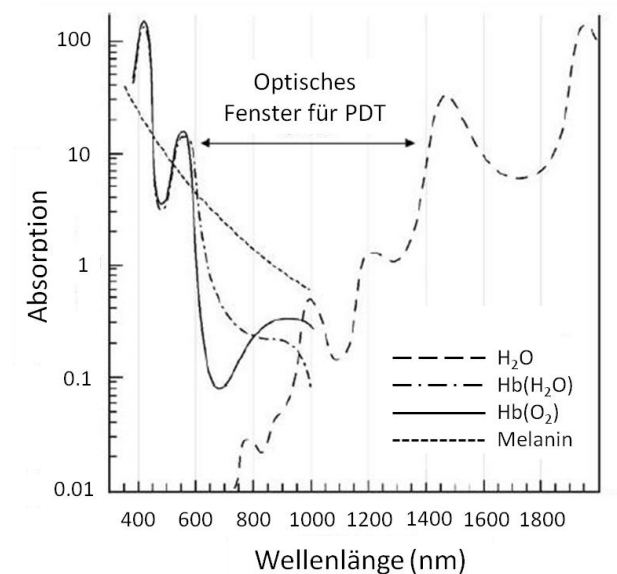


Abbildung 8: Oben: Optisches Fenster für die Photodynamische Therapie (Hb = Hämoglobin).^[44] Unten: Eindringtiefe verschieden farbigen Lichts in das menschliche Gewebe.^[52]

1.3.2 Photosensibilisatoren

Die meisten der heute eingesetzten Photosensibilisatoren gehören strukturell zur Gruppe der Porphyrine. Dies sind cyclische Tetrapyrrole, deren Kernstruktur das Porphin darstellt. Bekannte, natürlich vorkommende Vertreter dieser Verbindungsklasse sind die Hämgruppe des Hämoglobins, die für den Sauerstofftransport im menschlichen Blut verantwortlich ist sowie das Chlorophyll aus dem Photosystem der Pflanzen.

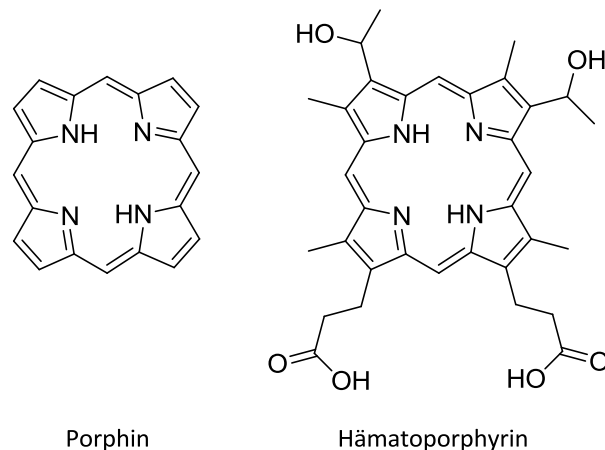


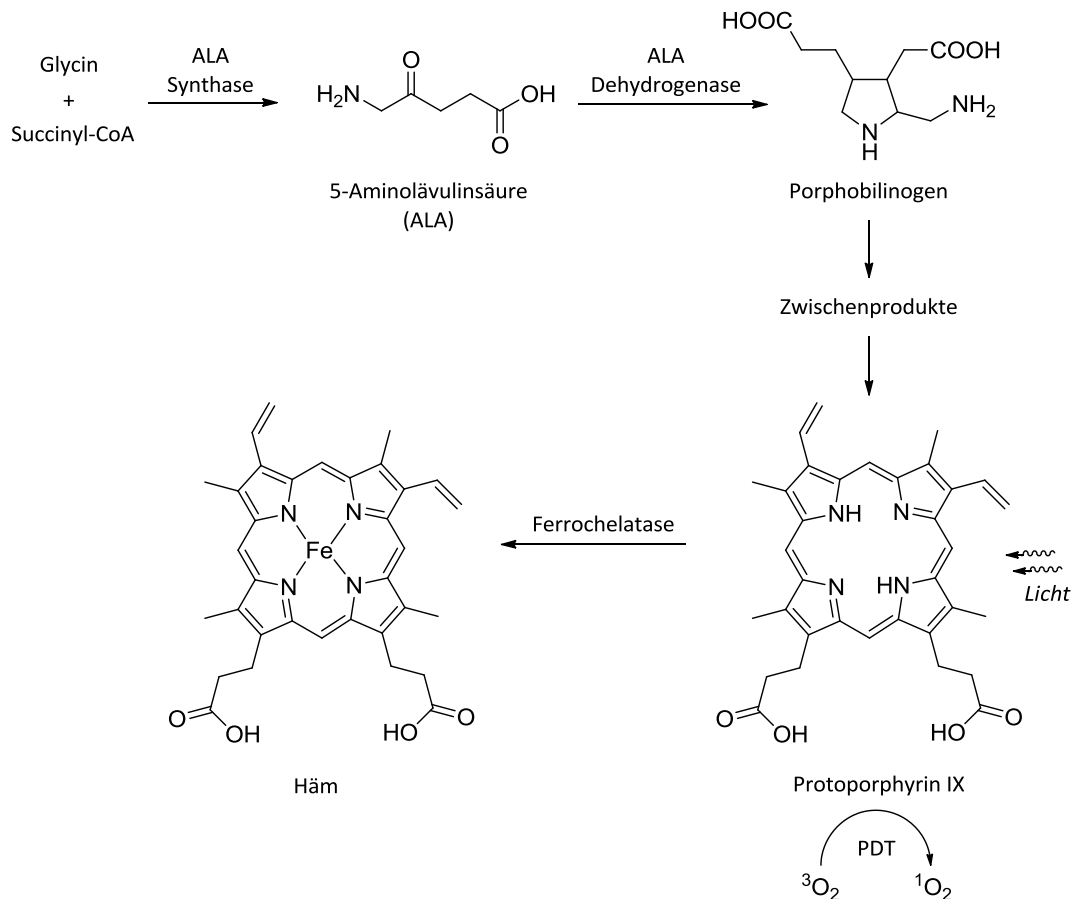
Abbildung 9: Das Porphin bildet die Grundstruktur der Porphyrine, eine der meist eingesetzten Verbindungsklassen in der PDT.

Bereits im 19. Jahrhundert wurde das, als Hämatoporphyrin bezeichnete, Porphyrin des Hämoglobins (Abbildung 9) durch saure Hydrolyse aus getrocknetem Blut isoliert und auf seine photochemischen Eigenschaften untersucht.^[43] Nach ersten Nachweisen einer photodynamischen Wirkung in eukaryotischen Zellen sowie auch in Mäusen, testete FRIEDRICH MEYER BETZ 1913 erstmals die Auswirkungen der Verbindung auf den menschlichen Organismus. In einem Selbstversuch mit 200 mg injiziertem Hämatoporphyrin stellte er eine starke und für Wochen andauernde photosensibilisierende Wirkung auf die Haut fest.^[53] Spätere Arbeiten, zu Beginn der 1950er Jahre, zeigten, dass sich reines Hämatoporphyrin nur bedingt für die Krebstherapie eignet, da es aufgrund seiner starken Polarität kaum in das Tumorgewebe eindringt. SAMUEL SCHWARTZ behandelte daraufhin die Verbindung mit einem Gemisch aus Essig- und Schwefelsäure und erhielt einen Photosensibilisator mit deutlich besseren Tumor-lokalisierenden Eigenschaften.^[43] Die neue Substanz bekam den Namen Hämatoporphyrin Derivat (HpD) und ist, wie sich herausstellte, ein Gemisch aus Mono-, Di- und Oligomeren der Ursprungsverbindung. Es ist davon auszugehen, dass eine gewisse Konzentration dieser Strukturen als Verunreinigungen bereits in früheren *in vivo* Versuchen vorhanden war und somit ursächlich für die damals beobachtete photodynamische Wirkung ist. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die verbesserte *in vivo* Aktivität des HpDs hauptsächlich auf die neu entstandenen Di- und

Oligomere zurückzuführen ist und in einem direkten Zusammenhang zu deren gesteigerter Lipophilie steht.^[54–56] 1976 wurde HpD zum ersten Mal in einer klinischen Studie von KELLY *et al.* an fünf Patienten mit Blasenkarzinomen untersucht.^[57] Kurze Zeit später entfernten DOUGHERTY *et al.* in einem weiteren Reinigungsschritt die überflüssigen Monomere aus dem HpD Gemisch und erreichten damit eine erneute Verdopplung der *in vivo* Aktivität.^[58] Dieser Wirkstoff wurde 1993 in Kanada unter dem Namen Photofrin erstmals für die Behandlung von Blasentumoren zugelassen und ist bis heute der meisteingesetzte Photosensibilisator in der Photodynamischen Therapie.^[52]

Hämatoporphyrin, HpD und Photofrin zählen zu den Photosensibilisatoren der ersten Generation. Zwar stellt der Einsatz von Photofrin immer noch den Standard in der PDT dar, jedoch ist der Wirkstoff weit davon entfernt, ein idealer Photosensibilisator zu sein. Eines der großen Probleme ist weiterhin die ungeklärte Zusammensetzung des Gemischs aus dimeren und oligomeren Komponenten, wobei unklar ist, welche der mehr als 60 Inhaltsstoffe tatsächlich für den photodynamischen Effekt verantwortlich sind. Des Weiteren liegt die Anregungswellenlänge mit 630 nm am unteren Rand des möglichen optischen Fensters und erlaubt daher nur eine geringe Tumorpenetration. Wie bereits von FRIEDRICH MEYER BETZ festgestellt, führt die Injektion von Hämatoporphyrinen zudem zu einer 4-6 wöchigen Photosensibilisierung der Haut, was eine zusätzliche Belastung für die Patienten darstellt.

Ein Ansatz aus der zweiten Generation zur Überwindung dieser Probleme ist der Einsatz von 5-Aminolävulinsäure (ALA). Dieser Wirkstoff ist selbst kein Photosensibilisator, sondern ein Zwischenprodukt der Häm-Biosynthese (Schema 1). Er entsteht auf natürlichem Weg aus der katalysierten Reaktion der beiden zelleigenen Stoffe Glycin und Succinyl-CoA und führt anschließend in weiteren Schritten zur Synthese des direkten Häm-Vorläufers Protoporphyrin IX (PPIX).^[59] Diese Verbindung ist ein guter Photosensibilisator, der auch im HpD enthalten ist.^[54] Die zusätzliche Gabe von ALA führt zu einer gesteigerten Häm-Biosynthese und in Folge dessen, zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration dieses Zwischenprodukts.^[60] Dabei wird die Tatsache genutzt, dass der letzte Schritt der Biosynthese vom Protoporphyrin zum Häm, deutlich langsamer verläuft, als die vorangegangenen Reaktionen und dadurch eine unnatürliche Anhäufung des Photosensibilisators verursacht.^[61] Eine anschließende Belichtung der Zellen erzielt dann die gewünschte photodynamische Wirkung. Mit diesem Ansatz wird das Problem der undefinierten Komponentenzahl auf einen einzelnen Wirkstoff reduziert und gleichzeitig der schwierige Transport des polaren Porphyrinmonomers in den Tumor umgangen. ALA ist unter dem Namen Levulan seit 1999 auf dem Markt zugelassen. Es zeigt eine schnelle Tumorakkumulation und eine Exkretion aus dem Körper innerhalb eines Zeitraums von 24 h.^[61]



Schema 1: Vereinfachte Häm-Biosynthese zur Darstellung der Wirkungsweise von 5-Aminolävulinsäure in der PDT.

In Bezug auf die Verbesserung der Anregungswellenlänge der Photosensibilisatoren, zeigt der Einsatz von Chlorin (2,3-Dihydroporphyrin) Derivaten sowie Derivaten der verwandten Verbindung Bacteriochlorin (2,3,12,13-Tetrahydroporphyrin) großen Erfolg (Abbildung 10). Ausschlaggebend ist dabei das, im Vergleich zu den Porphyrinen, um eine bzw. zwei Doppelbindungen reduzierte konjugierte π -Elektronensystem der Verbindungen, das zu einer Verschiebung der Absorptionsspektren in Richtung höherer Wellenlängen führt. Ein bereits zugelassener Wirkstoff dieser Verbindungsklasse ist das Verteporfin. Es besitzt ein Absorptionsmaximum bei 690 nm und erreicht damit eine um 50 % gesteigerte Tumorpenetration im Vergleich zum Photofrin. Weitere Vorteile des Wirkstoffs sind seine zeitnahe Aufnahme ins Tumorgewebe (30-150 min nach Injektion) sowie sein schneller Abbau, der die Photosensitivität der Patienten auf 1-2 Tage beschränkt.^[51] Als momentan potentester Photosensibilisator für die PDT gilt der 2001 in Europa zugelassene Wirkstoff Foscan (*meso*-Tetrahydroxyphenylchlorin). Er wird mit einer Wellenlänge von 650 nm angeregt und besitzt eine 100-fach gesteigerte Photoaktivität, verglichen mit Photofrin. Versuche, bei denen Foscan als Fluoreszenzmarker zur Lokalisation von Glioblastomen eingesetzt wurde, zeigten zudem eine

hohe Tumorselektivität der Verbindung.^[62] In einer Studie mit 128 Patienten, die an fortgeschrittenen Kopf und Hals Karzinomen erkrankt waren und mit keiner der herkömmlichen Therapien erfolgreich behandelt werden konnten, zeigte die Foscan-vermittelte PDT eine deutliche Reduzierung des Tumorgewebes und führte bei 53 % der Patienten zu einer signifikanten Verbesserung der Lebensqualität.^[63] Mit einem früheren Einsetzen der Therapie kann die Erfolgsaussicht der PDT noch gesteigert werden. Dies zeigt unter anderem eine Studie zur Behandlung von oralen Plattenepithelkarzinomen im Anfangsstadium. Hierbei führte die Foscan-vermittelte PDT in 85 % der Fälle zu einer kompletten Tumorremission, wobei 77 % dieser Patienten für mindestens zwei Jahre tumorfrei blieben.^[64] Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse, besitzt auch Foscan den Nachteil einer für mehrere Wochen andauernden Photosensibilisierung der Haut.

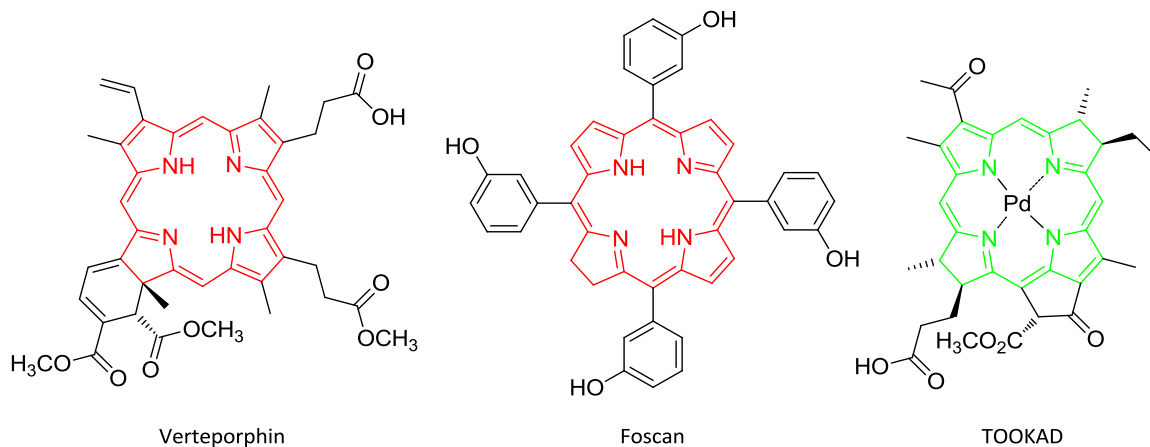


Abbildung 10: Chemische Struktur verschiedener Chlorin- (rot) und Bacteriochlorin- (grün) Photosensibilisatoren der zweiten Generation.

Das einzige Bacteriochlorin, das sich in fortgeschrittenen klinischen Tests für die Anwendung in der PDT befindet, ist der Photosensibilisator Tookad (Abbildung 10). Dies ist eine Palladium-haltige Verbindung, die sich vom Bacteriochlorophyll der Photosynthese-betreibenden Bakterien ableitet. Mit einer Anregungswellenlänge von 762 nm ist er den anderen Photosensibilisatoren der zweiten Generation deutlich überlegen, was die Penetration des Tumors betrifft. Anders als die bisher genannten Wirkstoffe lokalisiert Tookad hauptsächlich in den Blutgefäßen und greift dadurch die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Tumore an. Eine erste klinische Studie dieser Tookad-vermittelten vaskulären PDT zeigte bereits 2 h nach der Infusion eine verschwindend geringe Plasmakonzentration des Wirkstoffs. Des Weiteren konnte nach 3 h keine cutane Photosensitivität bei den Patienten mehr nachgewiesen werden.^[65] Diese Eigenschaften machen Tookad zusammen mit einigen aussichtsreichen *in vivo* Studien zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Behandlung nicht-oberflächiger Tumore, wie dem Prostatakarzinom.^[66] Ebenso in klinischen Tests befindet sich der Wirkstoff Lutrin (Lu-TeX), der

als Mitglied der Texaphyrine auf einem Tripyrrolpentaazaporphyrin basiert. Er wies bereits in *in vivo* Versuchen in einem Mausbrustkrebsmodell eine signifikante Steigerung der Tumoremision und Heilungsrate im Vergleich zum Photofrin auf, was größtenteils vermutlich auf seine höhere Anregungswellenlänge von 740 nm zurückzuführen ist.^[67]

Auf der weiteren Suche nach geeigneten Photosensibilisatoren stieß man auch auf die zu den Porphyrinisomeren gehörenden Porphycene (Abbildung 11).^[68] Diese noch nicht sehr lange bekannte Verbindungsklasse besitzt, neben einer charakteristischen Absorptionsbande oberhalb von 600 nm, ein hohes Potential zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies und zeichnet sich zudem durch eine hohe strukturelle Wandelbarkeit, aufgrund ihrer einfach zu modifizierenden Seitenketten, aus. Diese Eigenschaft ermöglicht es, durch chemische Veränderungen Einfluss auf die zelluläre Aufnahme des Wirkstoffs, eine gesteigerte ROS Produktion, die Halbwertszeit innerhalb des Organismus oder die zelluläre Lokalisation zu nehmen. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Porphycene synthetisiert und auf ihre Eignung für die PDT untersucht. Dabei zeigte sich eine geringe Neigung zur Verursachung von cutaner Photosensitivität, bedingt durch einen raschen Abbau im Körper und eine effektive Aktivierung apoptotischer und nekrotischer Prozesse im Tumorgewebe.^[66]

Eine bereits lange bekannte Verbindungsklasse aus der Fotografie, der Textil- und Elektroindustrie sind die Phthalocyanide (Abbildung 11). Sie besitzen mit stark ausgeprägten Absorptionsbanden zwischen 670 und 770 nm ebenfalls optimale photophysikalische Eigenschaften für die PDT und in Anwesenheit eines geeigneten Zentralatoms, wie Zink, Aluminium oder Silizium führt ihr verlängerter Triplett-Zustand zu einer effizienten Singulett Sauerstoff Produktion.^[69] Einer der aussichtsreichsten Kandidaten ist hier das Silizium Phthalocyanin Pc 4, das bereits in einer klinischen Phase I-Studie für die Behandlung von cutanen T-Zellen Lymphomen getestet wurde.^[70] Ähnlich wie bei den Porphycenen ist die hohe strukturelle Flexibilität einer der größten Vorteile dieser Verbindungsklasse.

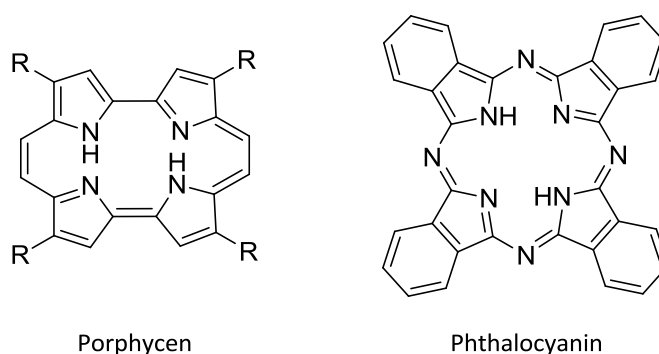
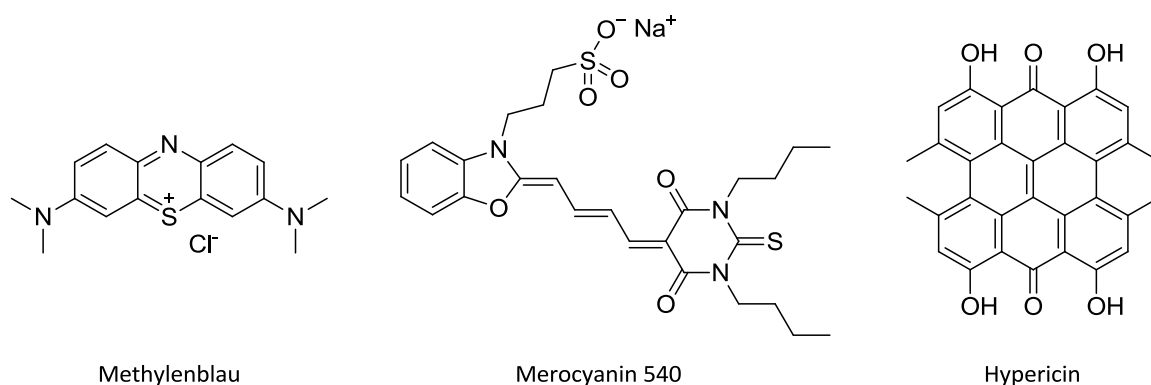


Abbildung 11: Porphycene und Phthalocyanine bilden die Kernstruktur einiger für die PDT untersuchten Photosensibilisatoren wie ATMPn, Pc 4, CGP55847 und Photosense.

Tabelle 1: Photosensibilisatoren in klinischen und präklinischen Studien für die Anwendung in der PDT. Blau unterlegt sind bereits als Medikament zugelassene Wirkstoffe.^[52,71]

Struktur	Photosensibilisator	Handels-name	Wellen-länge	Krebsart
Porphyrin	Porfimer Natrium	Photofrin	630 nm	Lunge, Speiseröhre, Ovar, Gallengang, Blase, Gehirn
Porphyrin-vorstufe	5-Amino-lävulinsäure	Levulan	635 nm	Haut, Blase, Gehirn, Speiseröhre
	5-ALA-methylester	Metvix	635 nm	Haut, Blase
	5-ALA-benzylester	Benzvix	635 nm	Gastrointestinaler Trakt
Chlorin	<i>m</i> -THPC Temoporphin	Foscan	652 nm	Kopf u. Hals, Lunge, Gehirn, Haut, Gallengang
	Verteporfin	Visudyne	690 nm	Auge, Bauchspeicheldrüse, Haut
	HPPH 2-(1-Hexyloxyethyl)- 2-devinyl pyropheophorbid- alpha	Photochlor	665 nm	Kopf u. Hals, Speiseröhre, Lunge
	Zinn Ethyl- etiopurpurin	Purlytin	660 nm	Haut, Brust
	Mono-L-aspartyl- chlorin e6, Npe6	Talaporfin	660 nm	Leber, Darm, Gehirn
	Photodithazin	Fotolon Radachlorin	660 nm	Nasenrachen, Sarkome, Gehirn
Bacterio-chlorin	Palladium Bacteria-pheophorbid	TOOKAD	762 nm	Prostata
Taxaphyrin	Lutetium Taxaphyrin	LuTex, Lutrin	732 nm	Brust, Prostata, Gehirn, Haut, Gebärmutterhals
Phthalo-cyanin	Silizium Phthalocyanin	Pc 4	675 nm	Cutanes T-Zellen Lymphom
	Zink Phthalocyanin	CGP55847	670 nm	Aerodigestivtrakt
	Aluminium Phthalocyanin- derivat	Photosense	675 nm	Haut, Brust, Lunge, Gastrointestinaltrakt
Porphycen	ATMPn, Acetoxytetrakis (β -methoxyethyl)- porphycen	/	600-750 nm	Haut
Rhodamin	TH9402, Dibromorhodamin- methylester	/	515 nm	Brust, Haut

Neben diesen Porphyrin-basierten und Porphyrin-verwandten Strukturen, die in den letzten Jahrzehnten ausgiebig für den Einsatz in der PDT untersucht und auf verschiedenste Weise strukturell verändert und optimiert wurden^[53], gibt es auch einige Vertreter unter den Photosensibilisatoren, die nicht zur Klasse dieser Verbindungen gehören. Darunter befinden sich die als Farbstoff bekannten Strukturen Methylen- und Toluidinblau sowie einige Cyanine, Chalcogenopyrylium Farbstoffe und das aus Pflanzenextrakten isolierte Chinon Hypericin (Abbildung 12). Methylenblau zeigte zunächst gute photozytotoxische Eigenschaften in *in vivo* Xenograftmodellen^[72] und auch erste klinische Tests^[73] verliefen positiv. Trotzdem hat die Verbindung einige Nachteile. So besitzt sie eine schlechte Tumorlokalisation^[74] und die, durch sie verursachten oxidativen DNA-Schäden, konnten von einigen Tumorzellen innerhalb von wenigen Stunden behoben werden.^[75] Hinzu kommt, dass die Verbindung durch zelluläre Enzyme zu einer farblosen, inaktiven Form reduziert wird.^[66] Ähnliche Erfahrungen wurden mit Cyaninfarbstoffen wie dem Merocyanin 540 gemacht. Auch hier verliefen die präklinischen Versuche positiv, allerdings konnte die Verbindung einem direkten Vergleich mit dem bereits zugelassenen Wirkstoff Foscan nicht standhalten.^[76] Generell hinkt die Entwicklung der nicht Porphyrin-verwandten Strukturen für die PDT den Porphyrinen hinterher und kämpft mit der Überwindung grundlegender Probleme, wie der Bioverfügbarkeit, der Anreicherung im Tumorgewebe, dem Auftreten von Dunkeltoxizität sowie einer ausreichenden Tumorpenetration.^[66] Zwar sind all diese Probleme in der einen oder anderen Weise von den bereits erwähnten Verbindungen in den klinischen Phasen gelöst worden, trotzdem gibt es bislang keinen Wirkstoff, der alle Eigenschaften eines perfekten Photosensibilisators in sich vereint. Eine intensive Forschung zur Verbesserung der bekannten Wirkstoffe sowie die Suche nach neuen Strukturen für die PDT sind daher unbedingt notwendig.



1.3.3 Wirkung der PDT im Tumorgewebe

1.3.3.1 Zelluläre Wirkungsweise

Reaktive Sauerstoffspezies sind ein natürlicher Bestandteil des zellulären Stoffwechsels und besitzen mitunter sogar wichtige Aufgaben bei der Abwehr von Infektionen oder der Weiterleitung von intrazellulären Signalen.^[77] Ihre Hauptquelle sitzt in der Atmungskette der Mitochondrien, wo sie in Form von Superoxidanionen bei der unvollständigen Reduktion von Sauerstoff zu Wasser entstehen. Die gesunde Zelle ist darauf eingestellt, ein gewisses Maß reaktiver Spezies zu tolerieren und durch Schutzmechanismen, wie die Superoxid Dismutase (SOD), Katalasen oder Glutathion abzufangen. Erst wenn das Gleichgewicht aus reaktiven Spezies und Antioxidantien aus den Fugen gerät, kommt es zu einer zellschädigenden Wirkung, die als oxidativer Stress bezeichnet wird.^[78–80] Im für die Zelle schlimmsten Fall sind die Schäden an Proteinen, Lipiden oder der DNA dabei so groß, dass es zu einer Einleitung des Zelltods kommt. In der PDT werden genau diese Schäden genutzt, um entartete Zellen selektiv aus dem Organismus zu entfernen. Dabei ist der genaue Wirkungsmechanismus, der zum Auslösen des Zelltods führt, von Wirkstoff zu Wirkstoff unterschiedlich und stark abhängig von der zellulären Lokalisation des Photosensibilisators, seiner Konzentration sowie der verabreichten Lichtdosis und dem Phänotyp der Zelle.^[81,82] Als eine der erfolgreichsten Positionen für die Induzierung des programmierten Zelltods, haben sich die Mitochondrien erwiesen.^[83,84] Hier lokalisieren unter anderem einige der Porphyrin-basierten Photosensibilisatoren sowie Pc 4, Verteporfin, Hypericin oder Methylenblau.^[82] Eines der ersten Ereignisse, nach der Lichtaktivierung dieser Wirkstoffe in der Zelle, ist die Ausschüttung des in den Mitochondrien vorhandenen Proteins Cytochrom c in das Zytosol.^[85–87] Dieser Vorgang ist bereits eines der irreversiblen Ereignisse, die zur Auslösung des programmierten Zelltods führen und wird gefolgt von der Bildung eines Komplexes aus Cytochrom c, dem Apoptose-aktivierenden Faktor 1 (APAF-1) und der Procaspase 9^[88] (Abbildung 13). Procaspasen sind die inaktiven Vorstufen einer Reihe von Cysteinproteasen, die im Zuge des programmierten Zelltods aktiviert werden. Ihre Funktion besteht darin, zunächst als Initiator-Caspasen (Caspase 8 und 9) weiterer Caspasen zu aktivieren, welche dann als Effektor-Caspasen die Degradation diverser Zellbestandteile übernehmen. Dabei werden Proteine, das Zytoskelett und der Nukleus inklusive DNA abgebaut und auf vesikelartige Strukturen verteilt, die als so genannte apoptotische Körper von Zellen des Immunsystems aufgenommen werden. Mit der Aktivierung der Procaspase 9 nach der Ausschüttung des Cytochroms c, ist damit der Weg in den Zelltod für die PDT behandelte Zelle bereits festgelegt. Wie genau es durch die Belichtung des Photosensibilisators zur Freisetzung des Apoptose-induzierenden Proteins kommt, ist jedoch noch nicht in allen Einzelheiten geklärt.

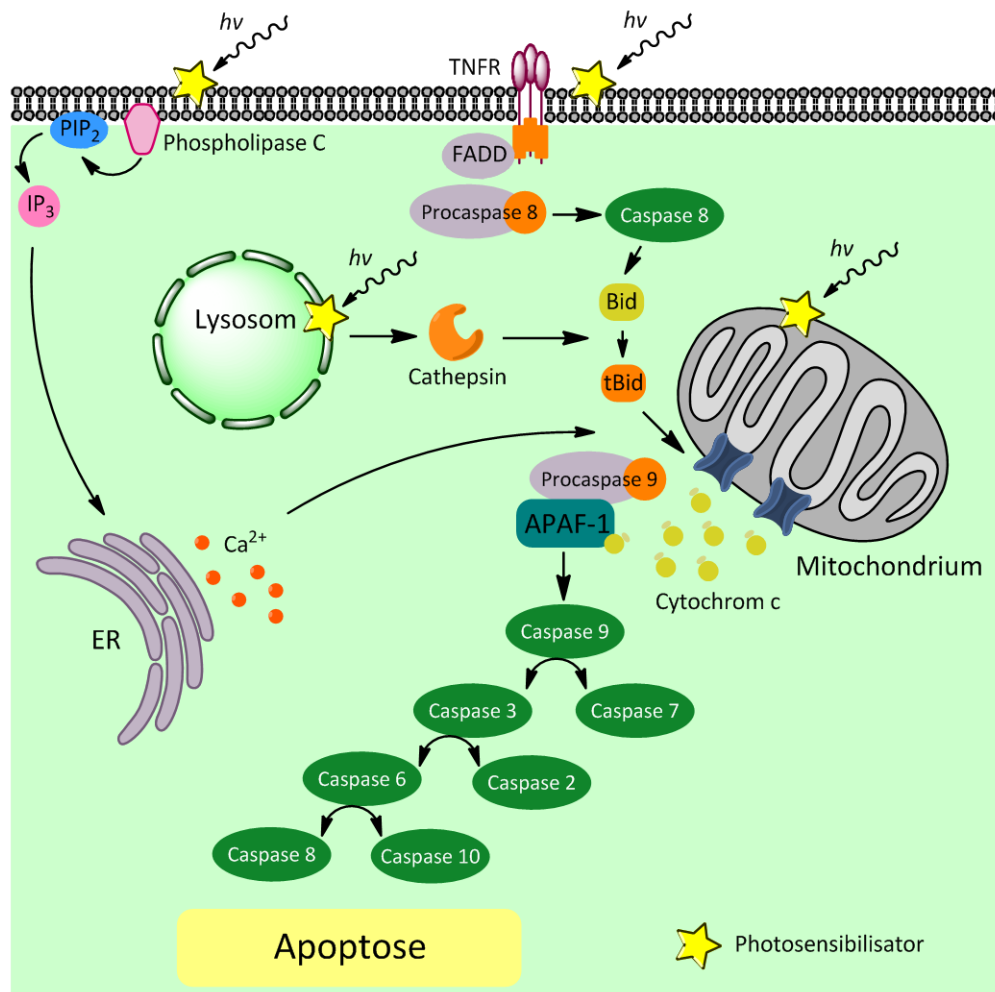


Abbildung 13: Apoptose-induzierende Signalwege verschieden lokalisierter Photosensibilisatoren.

Einige Arbeiten deuten darauf hin, dass die Öffnung eines Kanals, der die innere und äußere Mitochondrienmembran miteinander verbindet, der so genannte *permeability transition pore complex* (PTPC), eine entscheidende Rolle dabei spielt. Dies zeigt unter anderem eine Studie an menschlichen epidermoiden Krebszellen, bei denen ein PTPC-Inhibitor, die Cytochrom c Ausschüttung nach der photodynamischen Behandlung mit Pc 4 verhindert.^[89] Hinzu kommt die seit längerem bekannte Beobachtung, dass einige Porphyrine, wie das PPIX, mit hoher Affinität an eine Untereinheit des Permeabilitäts-Komplexes binden.^[90] Trotzdem scheint die Öffnung des PTPCs, nicht bei allen Photosensibilisatoren an der Auslösung des programmierten Zelltods beteiligt zu sein. In einigen Fällen, wie bei Hypericin, konnte in *in vitro* Studien eine PTPC-unabhängige Cytochrom c Ausschüttung beobachtet werden. Es wird vermutet, dass in diesem Fall unspezifische Membranschäden durch Lipidperoxidation für das Auslösen des Apoptosevorgangs verantwortlich sind.^[91]

Unabhängig von den Mitochondrien kann das Signal zur Einleitung des programmierten Zelltods auch von den Lysosomen ausgehen. Dies gilt insbesondere für Photosensibilisatoren, die

aufgrund ihrer schlechteren Membrangängigkeit über Endozytose aufgenommen werden und sich in Folge dessen, in den Lysosomen anreichern. Hierzu zählen unter anderem die Verbindungen Npe6 und LuTex. Ihre Photoaktivierung verursacht die Zerstörung der lysosomalen Membran und führt zur Freisetzung der in diesem Kompartiment enthaltenen Proteine in das Zytosol.^[92] Hierunter befinden sich zahlreiche Proteasen, wie die Cathepsine, die in der Lage sind, verschiedene Procaspasen zu spalten sowie das proapoptotische Protein Bid zu aktivieren.^[93,94] In seiner aktiven Form induziert Bid die Bildung porenartiger Strukturen in der mitochondrialen Membran und verursacht dadurch einen Ausstrom von Cytochrom c (Abbildung 13). Die anschließende Signalkaskade ist identisch zu der in den Mitochondrien lokalisierter Photosensibilisatoren.

Viele der hydrophoben Verbindungen, die in der PDT eingesetzt werden, durchqueren bei ihrer Aufnahme in die Zelle die Plasmamembran und reichern sich dadurch zumindest kurzzeitig in dieser an. Dies bedingt, dass auch dort Schäden und Veränderungen durch reaktive Sauerstoffspezies entstehen. Unter anderem konnte eine Aktivierung der dort lokalisierten Phospholipase C (PLC) festgestellt werden, verbunden mit einer schnellen Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum.^[95] Da die Inhibierung der PLC sowohl die Erhöhung des Ca^{2+} -Levels als auch den anschließenden Übergang der Zellen in die Apoptose verhinderte, ist davon auszugehen, dass auch dieser Weg eine Möglichkeit des PDT-induzierten Zelltods darstellt. Des Weiteren wird eine direkte oder indirekte Aktivierung Apoptose-induzierender Rezeptoren in der Plasmamembran diskutiert. Die Familie der TNF-Rezeptoren ist bekannt für die Einleitung des extrinsischen Apoptosesignalwegs durch die Bindung extrazellulärer Liganden, wie Fas oder TNF (Tumornekrosefaktor) und die anschließende Aktivierung der Procaspase 8. Wie in mehreren Studien gezeigt werden konnte, wird die Expression und Sekretion eben dieser Liganden durch die PDT erhöht.^[82] Außerdem könnte die direkte Aktivierung der Procaspase 8 durch den membranlokalisierten Photosensibilisator Rose Bengal ein Hinweis darauf sein, dass auch eine direkte Aktivierung der Rezeptoren durch reaktive Sauerstoffspezies möglich ist.^[96]

Die Forschungsergebnisse der letzten zwei Jahrzehnte haben gezeigt, dass es durch die PDT zu zahlreichen strukturellen Veränderungen und Signalwegaktivierungen innerhalb der Zellen kommt.^[81,82,97,98] Die entscheidende Aufgabe wird nun sein, herauszufinden, welche davon einen direkten Einfluss auf die Einleitung der Apoptose besitzen bzw. welche nur infolge der verursachten Stresssituation entstehen. Fest steht, dass die Apoptose die dominierende Form des Zelltods für die meisten PDT-behandelten Zellen ist. Dennoch kann eine Erhöhung der Dosis von Photosensibilisator und Licht auch das verstärkte Auftreten nekrotischer Zellen fördern.

1.3.3.2 Vaskulärer- und immunstimulierender Effekt

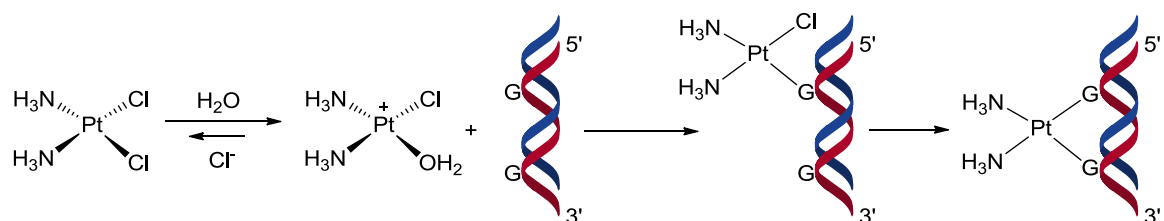
Im Vergleich zu den meisten anderen chemotherapeutischen Ansätzen der Krebstherapie, die eine Immunsuppression verursachen, existieren für die PDT zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien, die eine Stimulierung des Immunsystems demonstrieren.^[99,100] Eine solche Wirkung kann, neben dem direkten zytotoxischen Effekt, einen großen Einfluss auf die Rückbildung des Tumorgewebes und seine dauerhafte Eliminierung haben. Dies zeigt unter anderem eine Studie von CANTI *et al.* bei der Mäuse, die einmal einer PDT unterzogen wurden, resistent gegen eine zweite Infektion mit dem Tumor sind.^[101] Es wird vermutet, dass diese Eigenschaft mit der besonderen Art des stressinduzierten Zelltods der PDT zusammenhängt, bei der neben der Apoptose auch nekrotische Reaktionen ausgelöst werden. Dabei gelangen zahlreiche Moleküle, die normalerweise in der Zelle eingeschlossen sind, in den extrazellulären Raum und verursachen dort eine Entzündungsreaktion, die die Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert.^[102] Gefördert wird eine solche Reaktion durch die nachgewiesene gesteigerte Aktivierung entzündungsfördernder Faktoren wie NFκB in den PDT-behandelten Zellen.^[103] Diese bewirken die Ausschüttung von Interleukinen und unterstützen dadurch die Rekrutierung neutrophiler Immunzellen in das Tumorgewebe. Neben einer solchen Eliminierung beschädigter Tumorzellen durch das angeborene Immunsystem, existieren auch Hinweise auf die Aktivierung der erworbenen Immunität. In diesem Fall ist es dem Organismus möglich, die Tumorzellen als nicht-körpereigen zu erkennen und zu beseitigen. Dies zeigen Studien, bei denen die PDT zur Reduzierung sekundärer Tumore außerhalb des behandelten Bereichs geführt hat.^[104,105] Eine besondere Rolle wird dabei den Hitzeschockproteinen wie HSP70 zugeschrieben, deren Expression in PDT-behandelten Zellen stark hochreguliert ist.^[106] In ihrer Funktion als Chaperone stabilisieren sie ungefaltete Proteine und machen diese, durch die Bindung an Gefahrensignal-Rezeptoren, wie den Toll-like Rezeptor, der Erkennung durch dendritische Zellen zugänglich.^[107] Erst eine solche Erkennung von Tumor-spezifischen Antigenen, macht eine anschließende, gezielte Immunantwort möglich.

Zusätzlich zu dieser Wirkung auf das Immunsystem zeigt die PDT auch einen Einfluss auf die Gefäße innerhalb des Tumors. Hierbei wurden für die verschiedenen Photosensibilisatoren unterschiedliche vaskuläre Veränderungen, wie Vasokonstriktion, die Bildung von Thromben, eine Unterbindung des Blutflusses oder eine undichte Gefäßwand, beobachtet.^[108] All diese Veränderungen führen zunächst zu einer Unterversorgung des Tumorgewebes mit Sauerstoff und damit zu einer Verstärkung des therapeutischen Effekts. In der weiteren Folge führt der Sauerstoffmangel allerdings zu einer gesteigerten Ausschüttung angiogener Faktoren, wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*), die eine Neubildung von Gefäßen in den Tumor

einleiten.^[109] Damit wandelt sich die anfangs tumorschädigende Wirkung in einen Effekt, der das Wachstum des Tumors fördert. Dies ist der Grund, warum inzwischen einige Studien den kombinierten Einsatz von Photosensibilisatoren und Angiogeneseinhibitoren untersuchen.^[110]

1.4 Metalle in medizinischen und phototherapeutischen Anwendungen

Der Einsatz von Metallen in der Medizin feiert zunehmend Erfolge und bereichert die, von der Organischen Chemie dominierte, Medikamentenentwicklung mit neuartigen Wirkungsmechanismen.^[111] Neben Cisplatin (Schema 2), dem bislang erfolgreichsten metallhaltigen Wirkstoff und einem der meistverkauften Krebsmedikamente der Welt, finden Metallkomplexe mittlerweile auch in zahlreichen anderen diagnostischen und therapeutischen Gebieten Anwendung.^[111] So z.B. in Form von Gd(III)- und Mn(II)-Verbindungen als Kontrastmittel bei der Magnetresonanztomographie (MRT) oder als Radiopharmaka, wie im Falle verschiedener ^{99m}Tc- und ¹⁸⁶Re-Komplexe. Seit langem bekannt ist auch die antimikrobielle Wirkung von Silber, das in Kliniken in Form von AgNO₃-Lösungen oder Silbersulfadiazin zur Desinfektion von Wunden und Verbrennungen eingesetzt wird. In den meisten Fällen ist dabei die Wirkung des Medikaments direkt an eine spezielle Eigenschaft oder Wechselwirkung des Metalls mit seiner Umgebung gekoppelt.



Schema 2: Mechanismus der Reaktion von DNA mit Cisplatin.

Allerdings besitzen Metallkomplexe auch strukturelle Unterschiede zu rein organischen Verbindungen, die für das Wirkstoffdesign genutzt werden können. Im Vergleich zum Kohlenstoff bieten sie aufgrund ihrer erweiterten Koordinationsgeometrie deutlich mehr Anordnungsmöglichkeiten ihrer Liganden im dreidimensionalen Raum. Diese Eigenschaft nutzen MEGGERS *et al.* seit einigen Jahren zur Synthese inerter organometallischer Kinaseinhibitoren, basierend auf Übergangsmetallen, wie Ruthenium, Iridium und Rhodium.^[112–115] Die starre und stereochemisch komplexe Struktur der Inhibitoren ermöglicht dabei eine deutlich bessere Anpassung an biologische Gegebenheiten, wie die ATP-Bindetasche von Kinasen, verglichen mit rein organischen Molekülen (Abbildung 14).^[116] Dadurch ist es möglich, eine extrem hohe Selektivität innerhalb der mehr als 500 bekannten Proteinkinasen zu erreichen.

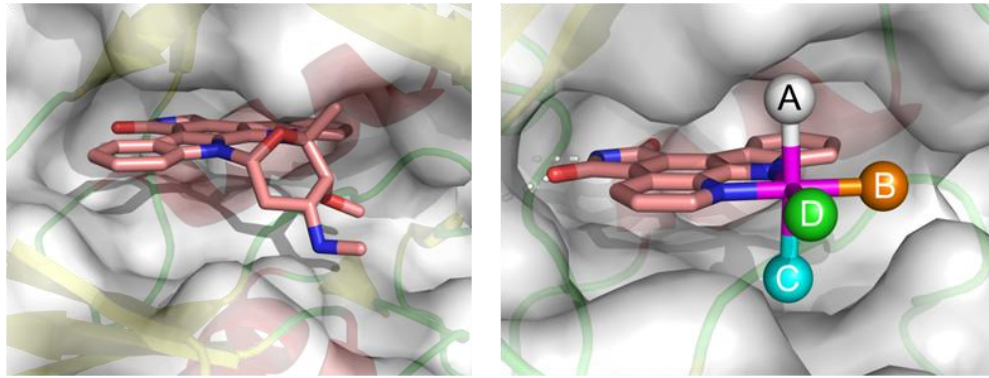


Abbildung 14: Darstellung der verbesserten Nutzung des dreidimensionalen Raums in der ATP-Bindetasche einer Kinase durch einen organometallischen Komplex mit den theoretischen Liganden A, B, C und D (rechts) verglichen mit dem rein organischen Kinaseinhibitor Staurosporin (links).

Auch in der Photodynamischen Therapie werden die Eigenschaften von Metallen genutzt, um gezielt die Photochemie und Photophysik der Wirkstoffe zu beeinflussen. Eines der Hauptziele ist dabei, die Quantenausbeute für die Singulett Sauerstoff Generierung zu maximieren. Diese ist normalerweise durch den Spin-verbotenen Übergang von S_1 nach T_1 begrenzt, kann aber durch die verstärkte Spin-Bahn-Kopplung eines schweren Atoms erhöht werden.^[117] Besonders Metalle der fünften und sechsten Periode eignen sich daher aufgrund ihrer hohen Kernladungszahl gut, um die Wahrscheinlichkeit einer Spinumkehr und die daran gekoppelte Singulett Sauerstoffrate zu steigern. Dies zeigt unter anderem der Vergleich verschiedener metallzentrierter Bacteriochlorine. In seiner natürlichen Form mit einem Mg^{2+} -Zentrum, besitzt der Photosensibilisator eine Triplett-Quantenausbeute von 76 %. Durch den Austausch gegen ein Zinkion, steigt die Rate bereits auf 85 % an und für das noch mal schwerere Palladium-Bacteriochlorin wird eine Triplett-Ausbeute von über 99 % erreicht.^[118] Ähnliche Versuche wurden auch mit Phthalocyaninen^[51] und Texaphyrinen^[119] durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass auch hier der Einsatz eines geeigneten Metallzentrums die *intersystem crossing* Rate maßgeblich beeinflusst und die Singulett Sauerstoffausbeute verbessern kann. Einige der bereits bekannten Strukturen aus der PDT werden daher zur Zeit auf ihre veränderten Eigenschaften durch ein Metallzentrum untersucht und zum Teil in präklinischen Phasen getestet.^[51]

Ein anderer therapeutischer Ansatz, der sich in der Entwicklung befindet, nutzt die photodissoziativen Eigenschaften bestimmter Metallkomplexe. Dabei werden koordinative Bindungen zwischen Metall und Ligand durch UV-Vis-Strahlung gespalten und kleine bioaktive Moleküle, wie NO, CO oder Neurotransmitter, selektiv an die Umgebung abgegeben.^[120] Der Vorteil gegenüber rein organischen Verbindungen ist hier die geringere Anregungsenergie, die in Form von Strahlung aufgewendet werden muss, um das bioaktive Molekül von seinem Träger zu befreien. Mögliche Anwendungsgebiete für solche photodissoziativen Komplexe finden sich vor allem in der Neurowissenschaft und bei der Untersuchung NO-abhängiger kardiovaskulärer

Signalwege. Beispiele sind der Ruthenium-basierte Komplex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABA})(\text{PPh}_3)]^{2+}$, der den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure nach Anregung mit sichtbarem Licht von 450 nm freisetzt^[121] oder der NO-abgebende Eisen-Komplex $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Des Weiteren existieren zahlreiche Metallkomplexe mit lichtinduzierten DNA-spaltenden Eigenschaften, die sowohl für wissenschaftliche, als auch therapeutische Anwendungen interessant sind. Seit einigen Jahren arbeiten Forscher daran, die Zytotoxizität von Platin-Verbindungen räumlich und zeitlich zu steuern, indem sie diese durch Bestrahlung aktivieren. Dabei werden die Redoxeigenschaften des Metalls genutzt, um ein zunächst inaktives Pt(IV)-Zentrum durch Photoreduktion, in den aktiven Pt(II)-Komplex zu überführen. Dieser Komplex reagiert dann nach dem Vorbild von Cisplatin mit dem DNA-Strang und führt zur Querverknüpfung benachbarter Nukleobasen.^[122–125] Neben diesem Ansatz des photoaktivierten *crosslinkings*, gibt es weitere Möglichkeiten der DNA-Modifikation, die auf der Oxidation des Doppelhelixstrangs beruhen. Hierzu werden häufig Ruthenium- und Rhodium-Komplexe mit planaren, aromatischen Liganden, wie 1,10-Phenanthrolin (phen) oder Dipyrido[3,2-*a*;2',3'-*c*]-phenazin (dppz), eingesetzt.^[120] Diese zeigen eine hohe Neigung zur Interkalation in den DNA-Strang und erzielen ihre Wirkung durch eine lichtinduzierte, oxidative Veränderung der Nukleobasen oder des Ribosezuckers, was häufig mit einem Strangbruch einhergeht. Der oxidative Schaden entsteht dabei in vielen Fällen nicht durch einen direkten Elektronenaustausch zwischen dem Nukleotid und dem Metallkomplex, sondern über einen Zwischenschritt bei dem $^1\text{O}_2$ entsteht. Neuere Arbeiten auf diesem Gebiet beschäftigen sich damit, diesen Prozess durch ein Bindungsmotiv räumlich zu steuern und damit selektive Veränderungen an bestimmten DNA-Abschnitten vorzunehmen.^[46]

Dies sind nur einige Beispiele für Metallkomplexe, die bereits in klinischen Anwendungen eingesetzt werden oder sich in einem Entwicklungsprozess dorthin befinden. Die Eigenschaften der Metalle, die dabei genutzt werden, sind vielfältig und erstrecken sich über ihre besondere Reaktivität, ihre strukturelle Komplexität und das Vorhandensein von Paramagnetismus und Radioisotopen bis hin zu ihrer hohen Kernladung und den daran gekoppelten Effekt von schweren Atomen auf die Spin-Bahn-Kopplung. Des Weiteren bieten ihre energetisch leicht zugänglichen Anregungszustände im Bereich des sichtbaren Lichts, eine Reihe von photoinduzierten Dissoziations-, Substitutions- und Redoxreaktionen für phototherapeutische Anwendungen. Ebenso unterschiedlich wie seine Eigenschaften, sind auch die Aufgaben, die das Metall dabei innerhalb eines Komplexes übernimmt. So kann es eine funktionale Rolle spielen und einen direkten Einfluss auf das biologische Ziel ausüben oder nur als Strukturgeber dienen, der keine Interaktionen mit seiner Umgebung eingeht. Es kann als Träger fungieren und einen

zunächst inaktiven Wirkstoff an seinen Bestimmungsort transportieren, um ihn dort als aktive Verbindung frei zu setzen oder als Katalysator die Entstehung zellschädigender Spezies fördern. Das mögliche Einsatzgebiet von Metallkomplexen in der Medizin und Biologie ist groß und wird vermutlich auch zukünftig einen wachsenden Bereich innerhalb dieser Forschungszweige einnehmen.

2 Aufgabenstellung

Krebs gehört nach wie vor zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen und das, obwohl es kaum eine Krankheit gibt, für die mehr Geld in die Erforschung und Entwicklung von Medikamenten investiert wird. Die optimistische Annahme der 70er Jahre, es könnte möglich sein, diese Krankheit binnen weniger Jahre zu besiegen, hat sich zu einem langwierigen Kampf mit vielen Rückschlägen entwickelt. Zu den größten Fortschritten der letzten Jahrzehnte zählt die Entwicklung der zielgerichteten Therapie, die sich erstmals gegen konkrete, in den Tumorzellen veränderte, Proteine richtet. Mit ihr war es möglich, die Heilungsraten einzelner Krebserkrankungen, wie der chronischen myeloischen Leukämie, deutlich zu erhöhen und die starken Nebenwirkungen bisheriger Medikamente einzudämmen. Trotzdem stellen die Individualität der Tumorerkrankungen sowie die enorme Anpassungsfähigkeit der entarteten Zellen und die dadurch entstehenden Resistenzen, weiterhin große Herausforderungen an die Krebstherapie dar. Eine Behandlungsmethode, die diese Probleme umgeht, ist die Photodynamische Therapie. Da sie ihren toxischen Effekt durch die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies erzielt, ist sie unabhängig von einem bestimmten Mutationsprofil der Zellen und besitzt durch die Lichtaktivierung trotzdem eine hohe Selektivität für das Tumorgewebe. Diese Eigenschaften verleihen der PDT ein deutlich breiteres Wirkungsspektrum, als das der meisten Inhibitoren der zielgerichteten Therapie und machen sie gleichzeitig selektiver als die cytotoxischen Wirkstoffe der konventionellen Chemotherapie. Zusätzlich steht die Photodynamische Therapie im Verdacht, eine erworbene Immunität des Körpers gegen die entarteten Zellen zu erzeugen und somit eine lang anhaltende Rückbildung des Tumorgewebes zu unterstützen. Trotzdem besitzt auch diese Behandlungsform ihre Schwachstellen. So begrenzt die Eindringtiefe der Strahlung in das entartete Gewebe die Wirksamkeit bei großen Tumoren und auch bereits gebildete Metastasen lassen sich nicht mit dieser Therapieform behandeln. Eine Kombination aus zielgerichteter und photodynamischer Therapie verspricht daher eine gegenseitige Ergänzung der Wirkungsmechanismen bei der Tumorbekämpfung und ein geringeres Auftreten von Resistenzen.

Der Ansatz dieser Arbeit ist es, neue Verbindungen zu finden, die beide Wirkungsweisen, die der zielgerichteten und die der lichtaktivierten Therapie, in sich vereinen. Dabei sollen nicht zwei bekannte Wirkstoffe miteinander gekoppelt werden, sondern beide Effekte durch eine einzige Struktur ausgelöst werden. Möglich ist dies durch die vielfältigen Eigenschaften organometallischer Komplexe, die sich sowohl durch ihre anspruchsvolle dreidimensionale Struktur, als auch durch ihre energetisch niedrigen Anregungszustände gut für dieses Vorhaben eignen. Bereits seit einigen Jahren nutzen MEGGERS *et al.* die starre und inerte Struktur Pyridocarbazol-

basierter Metallkomplexe für die Herstellung selektiver Kinaseinhibitoren. Dabei übernimmt das Metall lediglich eine koordinierende Wirkung und ermöglicht die Generierung stereochemisch anspruchsvoller Strukturen, wie sie zum Ausfüllen globulärer Proteintaschen notwendig sind. Zusätzlich zu dieser Eigenschaft konnte während meiner Masterarbeit eine lichtaktivierte zytotoxische Wirkung bestimmter Iridium-Komplexe festgestellt werden und damit der Grundstein für eine duale Wirkung gelegt werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist, verschiedene Pyridocarbazol-basierte Metallkomplexe auf ihre lichtinduzierte Wirkung in Krebszellen zu untersuchen und die Hintergründe des photozytotoxischen Effekts zu erklären. Hierzu gehört sowohl die Aufklärung der photochemischen Aspekte der Lichtaktivierung, als auch die Untersuchung der zellulären Ereignisse infolge der Bestrahlung. Dabei stehen besonders die Vorgänge zur Einleitung des Zelltods im Vordergrund. Des Weiteren ist es entscheidend, die Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Komplexe genauer zu betrachten, um ausgehend von den essentiellen Strukturelementen, eine Optimierung der Verbindungen zu ermöglichen. Dies gilt speziell in Bezug auf die Stabilität und Anregungswellenlänge der Komplexe. Zusätzlich soll die Kinase-inhibierende Eigenschaft der Komplexe weiter untersucht werden, um die Möglichkeiten einer dualen Funktionalität zu prüfen. Neben den bereits bekannten photozytotoxischen Iridium-Komplexen, liegt der Fokus dieser Arbeit dabei hauptsächlich auf Rhenium-Komplexen, die sich durch einen deutlich einfacheren Syntheseweg auszeichnen (Abbildung 15).

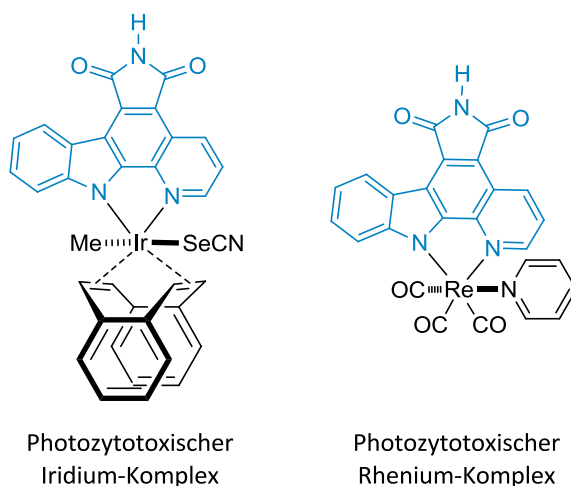


Abbildung 15: Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten photozytotoxischen Metallkomplexe. Blau hervorgehoben ist das als Pharmakophorligand dienende Pyridocarbazol, das in seiner ursprünglichen Bestimmung der Bindung im aktiven Zentrum von Proteinkinasen dient.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Metallkomplexe mit photozytotoxischen Eigenschaften

Wie zuvor erwähnt, bieten Metallkomplexe eine Reihe reaktiver, struktureller und photochemischer Eigenschaften, die sie von rein organischen Molekülen unterscheiden und zu interessanten Verbindungen für das Design bioaktiver Strukturen machen. MEGGERS *et al.* nutzen seit einigen Jahren die komplexe, unflexible Struktur organometallischer Komplexe für die Synthese selektiver Kinaseinhibitoren. Dabei dient ein von dem natürlichen, unspezifischen Kinaseinhibitor Staurosporin abgeleitetes, speziell entwickeltes Pyridocarbazol mit einer Maleimidfunktion als Pharmakophorligand für die Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms (Abbildung 16).^[126] Wie auch das Staurosporin, verdrängt das Pyridocarbazol das natürliche Substrat ATP und geht an seiner Stelle einen Kontakt mit der Kinase ein. Diese Bindung ist zunächst ebenfalls unspezifisch, wird jedoch durch die dreidimensionale Anordnung weiterer Liganden unterstützt. Die auf diesem Weg erzielte, am Metallzentrum abgestimmte, zugeschnittene Anpassung des Komplexes an die strukturellen Gegebenheiten des aktiven Zentrums, ermöglicht letztendlich die Entwicklung hoch selektiver, kompetitiver Inhibitoren. Basierend auf diesem Konzept sind in den letzten Jahren zahlreiche, nanomolare Inhibitoren für unterschiedliche Proteinkinasen, wie Pim1, GSK-3, PAK1, VEGFR, DAPK1 oder MLCK, entstanden.^[114,127–130]

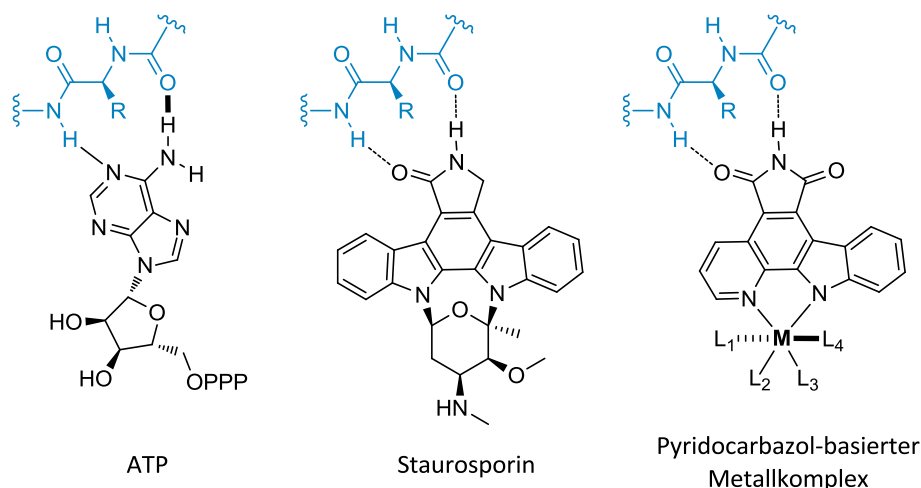


Abbildung 16: Vergleich der Bindung von ATP, Staurosporin und einem Pyridocarbazol-basierten Metallkomplex im aktiven Zentrum (blau) einer Proteinkinase.

Bereits in der zu dieser Arbeit vorangegangenen Masterarbeit konnte gezeigt werden, dass einige dieser Verbindungen, neben ihren inhibierenden Eigenschaften, auch einen lichtinduzierten zytotoxischen Effekt auf kultivierte Krebszellen besitzen. Dies ergaben Versuche an HeLa-Zellen, die mit verschiedenen Ruthenium- und Iridium-Komplexen behandelt und anschließend belichtet wurden (Abbildung 17).

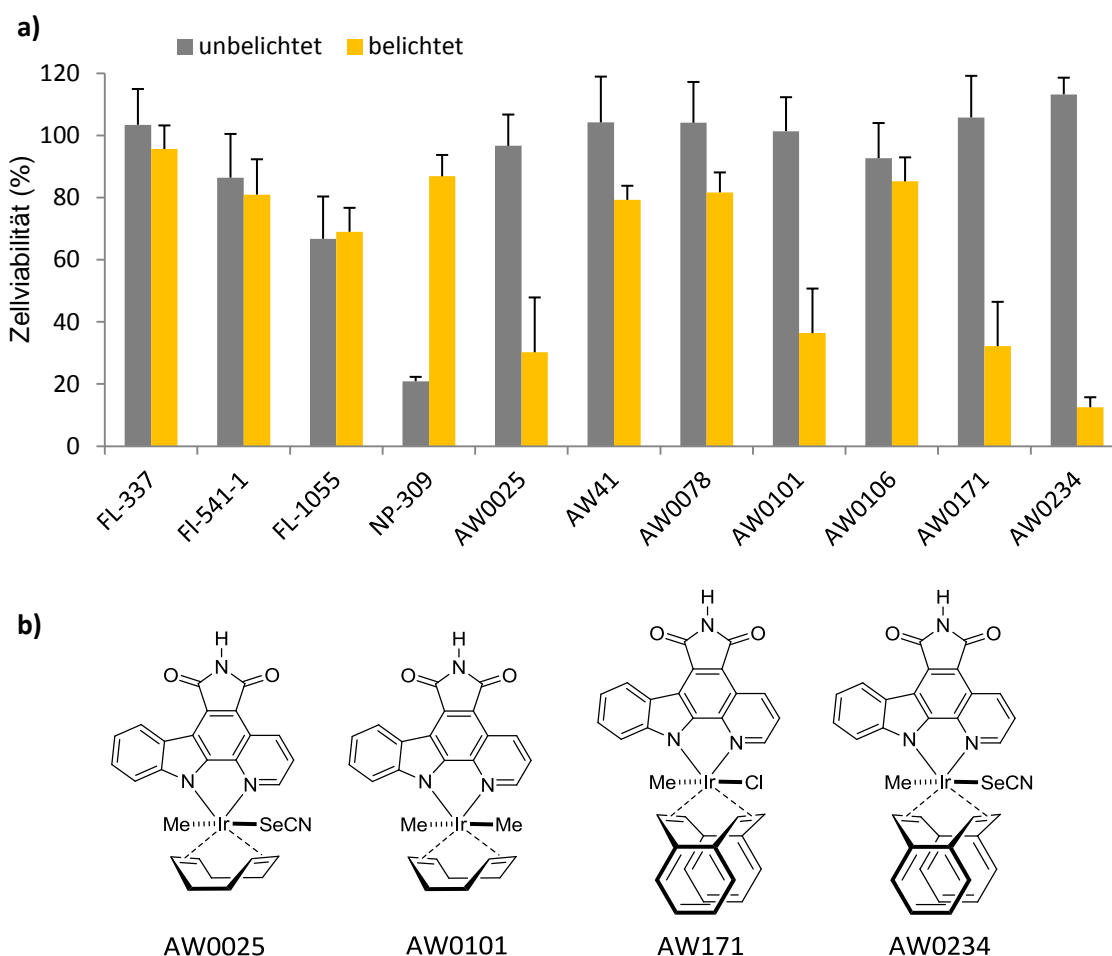


Abbildung 17: a) Gemessene Zellviabilität in HeLa-Zellen nach der Behandlung mit verschiedenen Ruthenium- und Iridium-Komplexen im Dunkeln (grau) und nach einer 15-minütigen Belichtung mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 330$ nm) (gelb). Die Komplexe wurden 1 h vor der Belichtung dem Kulturmedium der Zellen in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ zugegeben. 24 h nach der Zugabe wurde die Zellviabilität durch einen MTT-Test bestimmt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 18 Datenpunkten, die in zwei unabhängigen Versuchen ermittelt wurden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. **b)** Chemische Strukturen der vier ermittelten photozytotoxischen Iridium-Komplexe, für die eine Zellviabilität von weniger als 50 % nach der Belichtung festgestellt wurde.

Die Motivation zur Durchführung dieser Experimente liegt begründet in der bekannten Photoreaktivität einiger Übergangsmetallkomplexe, die durch das Vorhandensein energetisch leicht zugänglicher Anregungszustände ermöglicht wird. Diese gestatten es auch mit sichtbarem Licht molekulare Veränderungen, wie Liganden-Dissoziationen und -Substitutionen, auszulösen oder durch Redoxreaktionen und katalytische Prozesse Einfluss auf das chemische Umfeld der Verbindung zu nehmen. Damit besitzen Metallkomplexe einen Vorteil gegenüber organischen Molekülen, die häufig lediglich innerhalb des ultravioletten Spektrums angeregt werden können und sich daher nur bedingt für den Einsatz in biologischen Systemen eignen. Die Auswirkungen solcher lichtinduzierter Reaktionen auf zelluläre Systeme werden in der chemischen Biologie untersucht und haben nicht selten auch eine medizinische Relevanz gezeigt.

Für die in meiner Masterarbeit untersuchten Ruthenium- und Iridium-Komplexe konnte eine biologische Wirkung in Folge einer Belichtung für vier der elf getesteten Verbindungen nachgewiesen werden.^[131] Die Iridium-Komplexe AW0025, AW0101, AW0171 und AW0234 führten bei einer Konzentration von 1 μM und nach einer 15-minütigen Bestrahlung mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 330 \text{ nm}$) zu einer stark eingeschränkten Viabilität der behandelten Krebszellen. Dies zeigen die niedrigen Werte der Überlebensraten zwischen 13 und 36 %. Im Vergleich dazu schränkt die alleinige Belichtung der Zellen ohne den Einsatz eines Komplexes unter den gegebenen Bedingungen ($\lambda \geq 330 \text{ nm}$, Dauer: 15 min) die Viabilität der Zellen nur geringfügig ein ($79 \% \pm 7$).

In einer zweiten Versuchsreihe wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit weitere Komplexe auf einen photozytotoxischen Effekt untersucht. Dieses Mal mit dem Schwerpunkt auf Rhodium- und Rhenium-zentrierten Verbindungen. Dabei wurde für den Einsatz des Rhenium-Komplexes SEK030, unter den bereits genannten Bedingungen, eine Absenkung der Zellviabilität auf unter 1 % festgestellt (Abbildung 18). Der beobachtete Effekt ist damit noch deutlich ausgeprägter als bei den Iridium-basierten Verbindungen. Für die getesteten Ruthenium- und Rhodium-Komplexe konnte innerhalb dieser ersten beiden Versuchsreihen kein lichtinduzierter Einfluss auf die Wachstums- und Überlebensraten der Zellen festgestellt werden.

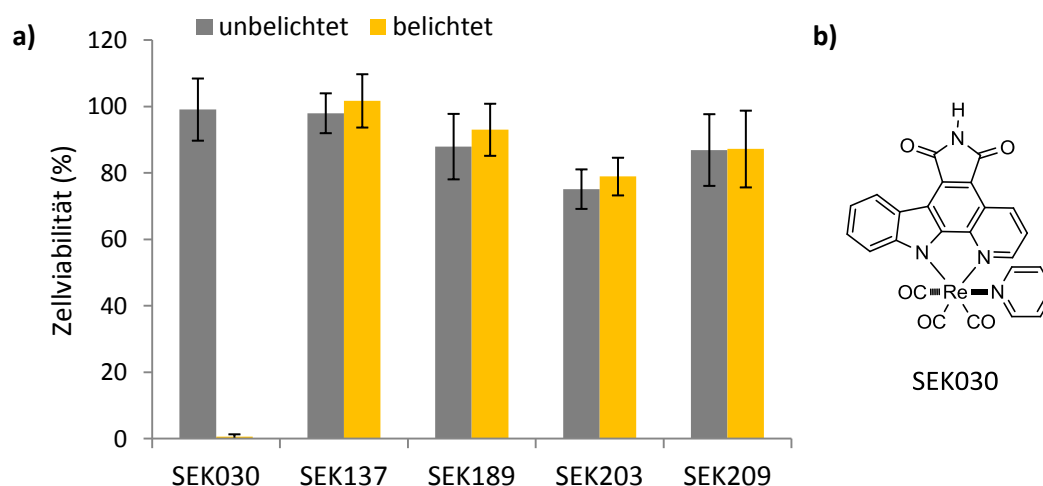


Abbildung 18: **a)** Bestimmung der Zellviabilität von HeLa-Zellen durch einen MTT-Test 24 h nach der Zugabe verschiedener Rhenium- (SEK030-1 μM , SEK189-10 μM) und Rhodium-Komplexe (SEK137-1 μM , SEK203-1 μM , SEK209-10 μM). Die belichteten Proben wurden 1 h nach der Zugabe der Komplexe für 15 min mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 330 \text{ nm}$) bestrahlt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 18 Datenpunkten, die in zwei unabhängigen Versuchen ermittelt wurden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. **b)** Struktur des einzigen Komplexes mit einer lichtinduzierten Photozytotoxizität. Die Strukturen der anderen Komplexe befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

Ausgehend von diesem ersten Nachweis einer lichtaktivierten Zytotoxizität wurden die zwei Komplexe mit dem größten sichtbaren Effekt, AW0234 und SEK030, für weitere Analysen ausgewählt. An zwei unterschiedlichen Zelllinien wurde hierbei zunächst die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) für den beobachteten Effekt bestimmt (Abbildung 19). Dieser Wert ist definiert als diejenige Konzentration, bei der 50 % der Zellen die gewünschte Reaktion auf eine bestimmte Behandlung zeigen. In diesem Fall ist dies eine eingeschränkte Viabilität in Form eines reduzierten Wachstums oder eines verstärkt auftretenden Zelltods. Für die Versuche wurde erneut die humane Zervixkarzinom Zelllinie HeLa ausgewählt sowie zusätzlich die multiresistenten Kolonkarzinomzellen HT29. Beide Zelllinien wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Komplexe von 0.01-100 μM behandelt und anschließend für 1 h mit sichtbarem Licht bestrahlt. Aufgrund der leicht unterschiedlichen Absorptionsmaxima der Komplexe, wurde für die Verbindung AW0234 ein Filter mit $\lambda \geq 450 \text{ nm}$ gewählt, während bei den mit SEK030 behandelten Zellen ein Filter mit $\lambda \geq 505 \text{ nm}$ zum Einsatz kam. Die Ergebnisse zeigen relativ einheitliche EC_{50} -Werte für den lichtinduzierten Effekt, unabhängig von der Verbindung oder der Zelllinie. In HeLa-Zellen besitzt die Verbindung AW0234 nach Belichtung einen EC_{50} -Wert von 0.2 μM (± 0.0), in HT29-Zellen von 0.3 μM (± 0.1). Für den Komplex SEK030 wird eine mittlere effektive Konzentration in HeLa-Zellen von 0.1 μM (± 0.0) erreicht, die in HT29-Zellen fast identisch bei 0.1 μM (± 0.1) liegt. Im Gegensatz dazu liegen die EC_{50} -Werte der unbelichteten Verbindungen um einen Faktor 35 bis 1000 über den Werten der belichteten. Der Komplex AW0234 zeigt in HeLa-Zellen die geringste Differenz zwischen Licht- und Dunkeltoxizität, die hier bereits bei 7.1 μM (± 0.6) ihren mittleren effektiven Wert hat. In den HT29-Zellen ist der Wert leicht erhöht auf ca. 16 μM . Für den Komplex SEK030 ist der durch die Belichtung erreichte Effekt deutlich größer. Hier liegt der EC_{50} -Wert im Dunkeln in den HeLa-Zellen außerhalb des gemessenen Bereichs und ist somit größer als 100 μM , in den HT29-Zellen erreicht er einen Wert von etwa 18 μM . Die Werte für die Dunkeltoxizität können lediglich als Abschätzung gesehen werden, da die Verbindungen dazu neigen, bei Konzentrationen über 5 μM im Zellkulturmedium auszufallen. Das ist auch der Grund, warum die sigmoidalen Kurven der Dunkeltoxizität in den HT29-Zellen nicht, wie zu erwarten, bei einer Überlebensrate von 0 % auslaufen, sondern knapp unterhalb von 50 % stagnieren. Die Ergebnisse zeigen, dass der beobachtete lichtinduzierte zytotoxische Effekt in Bezug auf seine Konzentrationsabhängigkeit und im Rahmen der Messgenauigkeit annähernd identisch für beide Komplexe und beide Zelllinien ist. Dies ist erstaunlich, da die eingesetzten HT29-Zellen dafür bekannt sind, resistent gegenüber einer Vielzahl bekannter Chemotherapeutika zu sein und somit häufig eine verminderte Reaktion auf getestete Wirkstoffe zeigen.

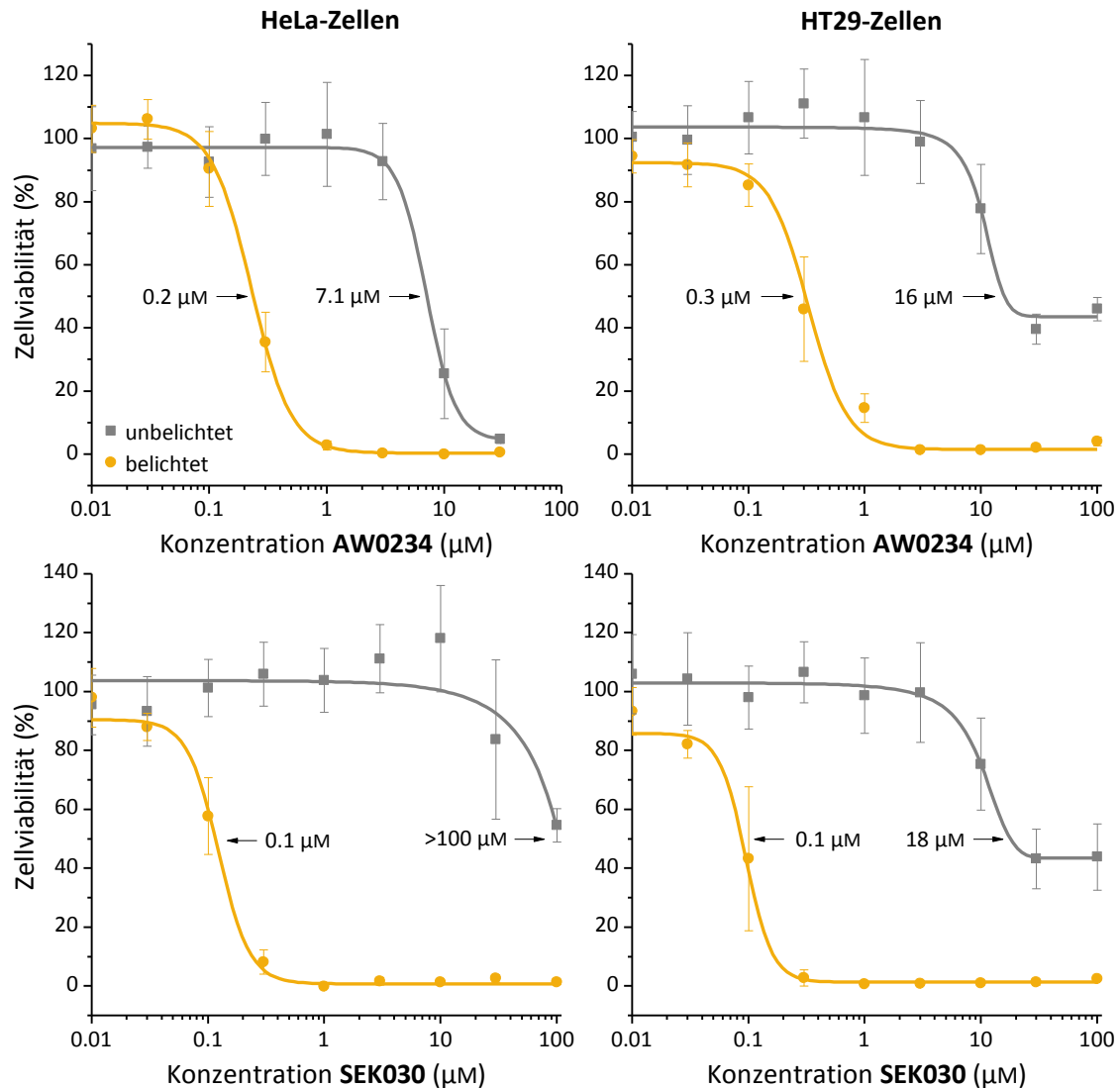


Abbildung 19: Gemessene EC_{50} -Kurven der Verbindungen AW0234 und SEK030 in HeLa- und HT29-Zellen. Die Verbindungen wurden 1 h vor dem Start der Belichtung in den angegebenen Konzentrationen dem Medium der kultivierten Zellen beifügt. Die anschließende 60-minütige Belichtung fand mit einer Xe/Hg-Bogenlampe statt mit $\lambda \geq 450$ nm für AW0234 und $\lambda \geq 505$ nm für SEK030 behandelte Zellen. 24 h nach der Zugabe der Verbindungen wurde die Viabilität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt. Die dargestellten Datenpunkte sind Mittelwerte 18 einzeln gemessener *wells* aus zwei unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Bei einer Überlebensrate von 50 % sind die entsprechenden EC_{50} -Werte angegeben.

Resistenzen sind ein großes Problem in der Krebstherapie, weshalb es auch in der Pharmaindustrie heutzutage üblich ist, potentielle Wirkstoffe auf ihre Effektivität gegenüber multiresistenten Zellen zu testen. Eine dabei gemessene verminderte Toxizität kann bereits ein Ausschlusskriterium für die weitere Untersuchung der Verbindung sein. Die hier dargestellten Ergebnisse deuten demnach darauf hin, dass die Belichtung der Komplexe AW0234 und SEK030 zu einer sehr direkten Einleitung des Zelltods führt, die nicht so leicht durch Anpassungen der entarteten Zellen umgangen werden kann. Dies ist eine Eigenschaft, die auch für die Photosensibilisatoren aus der PDT bekannt ist.

Neben der Untersuchung der Photozytotoxizität an den bislang beschriebenen 2D-Kultursystemen, wurde die Verbindung SEK030 auch in dreidimensionalen Sphäroidsystemen untersucht. Diese Versuche wurden am *Wistar Institute* in Philadelphia in der Arbeitsgruppe von MEENHARD HERLYN von ADINA VULTUR und BATOOL SHANNAN durchgeführt. Hierfür wurden die, in eine Kollagenmatrix eingebetteten, Sphäroide der Melanomzelllinien WM3918 und 1205Lu mit 1 μM SEK030 behandelt. Eine Stunde nach Zugabe des Komplexes wurden die Sphäroide für 1 h mit einer LED-Lampe bestrahlt und anschließend im Dunkeln inkubiert. 24 h nach der Stimulierung wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzmarker angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Solche dreidimensionalen Zellkultursysteme repräsentieren die tatsächlichen Gegebenheiten eines Tumors deutlich besser, als die normale Einzellschichtkultur. Ähnlich, wie in einem echten Gewebe, können die Zellen hier Zellkontakte ausbilden, die das Proliferationsverhalten einschränken, gleichzeitig aber die Widerstandsfähigkeit der Zellen erhöhen und damit ihr Überleben fördern. Außerdem besitzen die Sphäroide, wie ein Tumor, einen hypoxischen Kern, in dem eine mangelhafte Sauerstoffversorgung vorliegt. Aus diesen Gründen werden in den letzten Jahren potentielle Wirkstoffe zunehmend auch in 3D-Kultursystemen untersucht. Die Ergebnisse der lichtaktivierten Behandlung mit SEK030 im Rahmen dieser Arbeit zeigen ein verstärktes Auftreten toter Zellen (rot) im Inneren der Sphäroide (Abbildung 20). Eine komplette Destruktion der Zellaggregate konnte unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht erreicht werden. Trotzdem zeigt dieses Ergebnis, dass der Komplex seine photozytotoxische Wirkung auch unter *in vivo*-nahen Bedingungen beibehält. Ohne Belichtung ist, genau wie in der 2D-Kultur, kein Einfluss auf die Viabilität der Zellen festzustellen. Dies geht aus einer Kontrolle mit 20 μM SEK030 hervor. Die alleinige Belichtung der Sphäroide, ohne Zusatz eines Metallkomplexes, führt zu einer gewissen Zerstörung der Zellen, ist aber in der Wirkung deutlich geringer als eine kombinierte Behandlung.

Zusammengefasst zeigen die durchgeführten Analysen dieses Abschnitts eine konstante lichtinduzierte Zytotoxizität der Komplexe AW0234 und SEK030 in verschiedenen Krebszelllinien. Dabei konnte kein Unterschied in der Ausprägung des Effekts zwischen normalen und multiresistenten Zellen festgestellt werden. Des Weiteren zeigt der Komplex SEK030 auch in dreidimensionalen Zellaggregaten einen zytotoxischen Effekt, was eine gute Voraussetzung für eine bislang nicht untersuchte *in vivo* Wirkung ist. Aufgrund des etwas stärkeren photozytotoxischen Effekts, wurden die weiteren Untersuchungen dieser Arbeit, zur zellulären Wirkungsweise der Komplexe, hauptsächlich mit der Verbindung SEK030 durchgeführt.

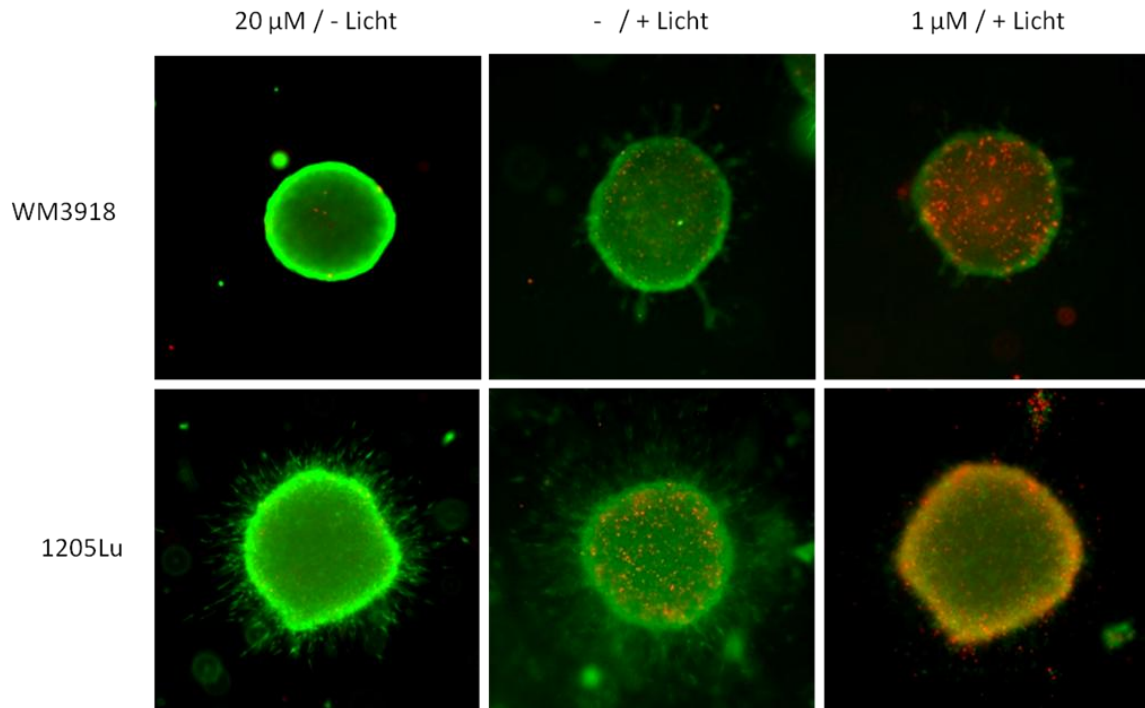


Abbildung 20: Nachweis einer photozytotoxischen Wirkung von SEK030 in Sphäroiden der Melanomzelllinien WM3918 und 1205Lu. Die in einer Kollagenmatrix eingebetteten Sphäroide wurden mit der angegebenen Konzentration des Rhenuimkomplexes SEK030 behandelt und nach 1 h Inkubation für 1 h mit einer LED-Lampe belichtet (Abstand 23.5 cm). 24 h nach der Belichtung wurden die überlebenden Zellen grün und tote Zellen rot angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (4 \times Objektiv).

3.2 Photochemische und zelluläre Ursachen des photozytotoxischen Effekts

Nach der Entdeckung der photozytotoxischen Wirkung einiger getesteter Iridium- und Rhenium-Verbindungen, bestand ein Schwerpunkt dieser Arbeit in der Aufklärung der photochemischen und zellulären Ursachen dieses Effekts. In einem ersten Schritt wurde hierfür der zeitliche Ablauf vom Beginn der Belichtung bis zum Eintreten des Zelltods genauer untersucht. Eine solche Echtzeitbetrachtung der Zellviabilität ermöglicht das für diesen Zweck entwickelte *xCELLigence* System. Es misst, über speziell in den Boden der Kulturplatte eingearbeitete Elektroden, den Kontakt der Zellen zu ihrem Untergrund. Da dieser normalerweise erst mit dem Eintreten des Zelltods verloren geht, ist diese Größe ein verlässlicher Indikator für die Viabilität kultivierter Zellen. Für den Versuch wurden HeLa-Zellen mit 3 μ M der Verbindung SEK030 behandelt und anschließend für 1 h im Dunkeln inkubiert. Danach wurde ein Teil der Zellen für 1 h mit einer LED-Lampe belichtet. Das Ergebnis zeigt einen sehr schnellen Verlust der Zelladhäsion, der bereits wenige Minuten nach dem Start der Belichtung beginnt und innerhalb einer halben Stunde abgeschlossen ist (Abbildung 21). Ein Vergleich mit anderen Arbeiten ergibt, dass viele der bekannten Wirkstoffe aus der konventionellen Chemotherapie eine deutlich längere Reaktionszeit besitzen.

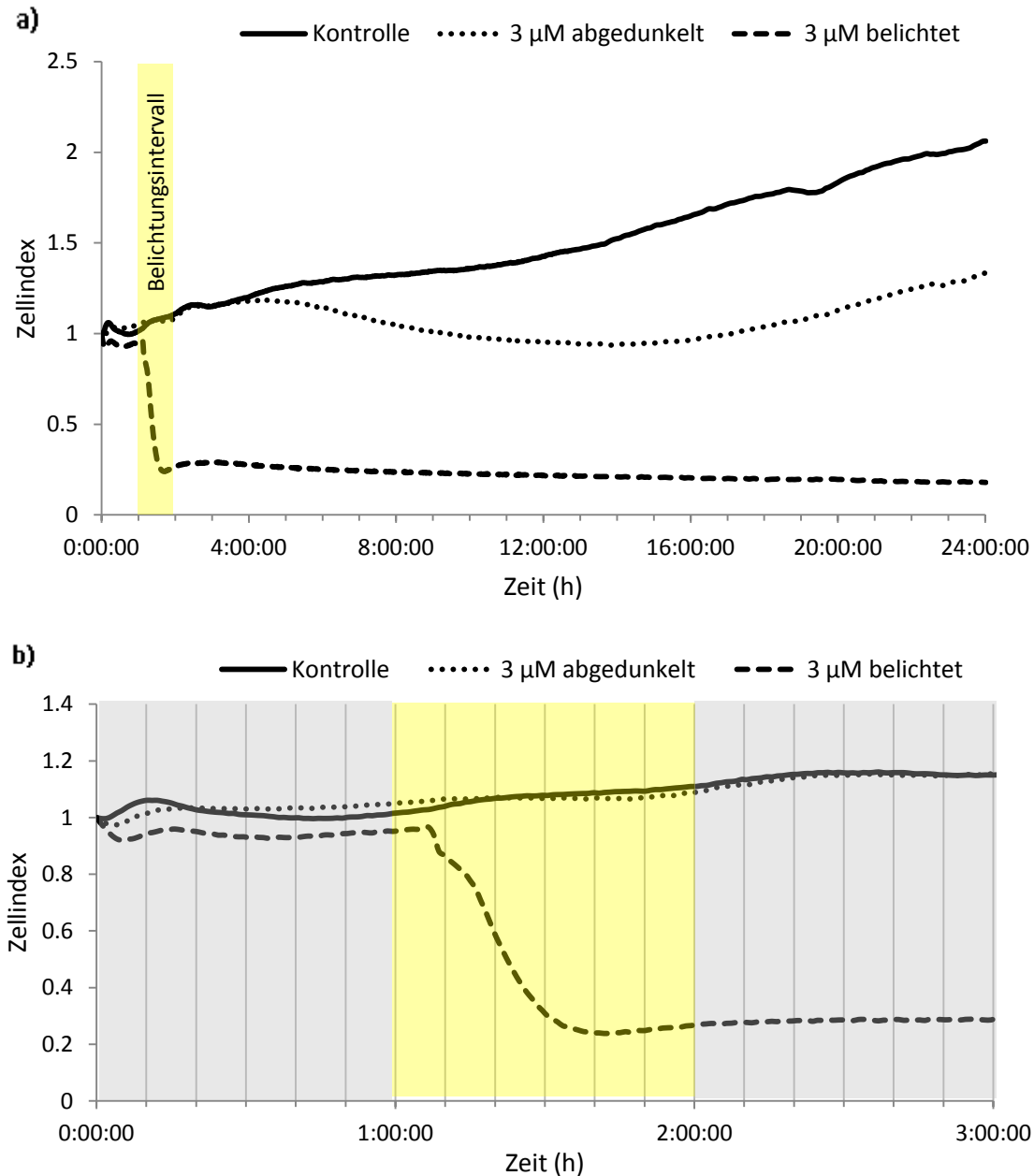


Abbildung 21: Bestimmung der Zellviabilität in Echtzeit mit Hilfe des *xCELLigence* Systems. HeLa-Zellen wurden in speziellen 96-well Mikrotiterplatten (*E-Plates*) ausgesät und für 24 h inkubiert. Zum Zeitpunkt null wurden die Zellen mit 3 µM des Komplexes SEK030 bzw. einer DMSO-Kontrolle behandelt und 1 h später mit einer LED-Lampe belichtet. Die dargestellten Daten zeigen den Kurvenverlauf der **a)** ersten 24 h bzw. **b)** ersten 3 h nach der Probenzugabe. Der gemessene Zellindex wurde vor Beginn der Datenaufzeichnung normiert und die Werte von je zwei unabhängigen *wells* gemittelt.

In einer Studie über den kombinierten Einsatz von Cisplatin und Brusatol zeigt eine alleinige Behandlung mit 18 µM Cisplatin erst nach etwa 10 h eine Abnahme in der Zelladhäsion.^[132] Ähnliche Ergebnisse sind auch für die Wirkstoffe Paclitaxel und Actinomycin D bekannt, deren Einfluss auf die Echtzeitzellviabilität in einer Studie von NIEMI *et al.* gemessen wurde. Bei beiden Medikamenten dauerte der Vorgang bis zum kompletten Verlust der Zelladhäsion über 60 h.^[133]

Die hier dargestellten Ergebnisse deuten demnach auf eine außergewöhnlich schnelle Einleitung des Zelltods hin, die vermutlich auf einem sehr direkten Weg stattfindet und keiner langen Signalkaskaden oder Genexpressionen bedarf. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für die hier nicht graphisch dargestellten gemessenen Zelllinien HT29 und HepG2 gezeigt werden. Das beweist, dass der beobachtete Effekt nicht spezifisch für HeLa-Zellen ist. Bei Änderung der Konzentration konnte eine zeitliche Verschiebung des Ablösens der Zellen um bis zu einer Stunde bei, niedrigeren Dosen des Komplexes, festgestellt werden. Ab einer Konzentration von 30 nM oder weniger ist kein Einfluss auf die Adhäsion der Zellen mehr messbar. Im Vergleich dazu ist, ohne den zusätzlichen Einsatz einer Belichtung, erst ab einer Konzentration von 10 μM ein Kontaktverlust zu beobachten, der in diesem Fall etwa 8 h nach der Komplexzugabe einsetzt. Die graphische Darstellung dieser Ergebnisse befindet sich im Anhang.

Ausgehend von diesen ersten Erkenntnissen, wurde in einem weiteren Schritt die Morphologie der Zellen nach der kombinierten Behandlung mit SEK030 und Licht untersucht. Hierfür wurden auf einem Objektträger kultivierte HeLa-Zellen zunächst mit 1 μM der Verbindung SEK030 behandelt und anschließend für 15 min mit einer LED-Lampe belichtet. Durch eine Färbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen *Wheat Germ Agglutinin-Tetramethylrhodamine* (WGA-TMR) und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) wurden die Plasmamembran und der Zellkern sichtbar gemacht. In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Zellen nach der alleinigen Behandlung mit SEK030 (Abbildung 22a) sowie nach einer Belichtung in Abwesenheit des Komplexes (Abbildung 22b) ihre gewohnt triangelförmige Gestalt mit einer glatten Membran und einem klar abgegrenzten Zellkern. 30 min nach der kombinierten Behandlung mit SEK030 und Licht (Abbildung 22c) hat ein Großteil jedoch eine runde Form angenommen, was den schnellen Kontaktverlust der Zellen zum Untergrund aus den *xCELLigence* Messungen bestätigt. Zusätzlich sind in der Membran zahlreiche kleine blasenartige Strukturen zu sehen.

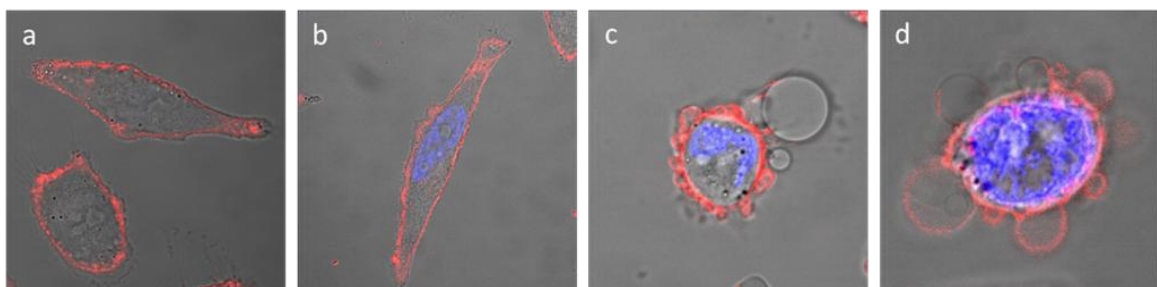


Abbildung 22: Überlagerte Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen von HeLa-Zellen **a)** 1 h nach der Behandlung mit 1 μM SEK030, **b)** 1 h nach einer 15-minütigen Belichtung in Abwesenheit von SEK030, **c)** 30 min nach einer 15-minütigen Belichtung in Anwesenheit von 1 μM SEK030, **d)** 2 h nach einer 15-minütigen Belichtung in Anwesenheit von 1 μM SEK030. Im Anschluss an die einstündige Inkubationszeit des Komplexes bzw. die Belichtungsphase, wurden die Zellen mit dem Plasmamembran-lokalisierten Farbstoff WGA-TMR (rot) und dem Kern-lokalisierten Farbstoff DAPI (blau) angefärbt. Die Aufnahmen wurden mit einem 63 \times Objektiv aufgenommen.

Der Zellkern ist zwar noch klar abgegrenzt, füllt aber in den geschrumpften Zellen fast das gesamte Zytoplasma aus. Weitere 90 min später (Abbildung 22d) hat sich die Anzahl der Blasen in der Membran reduziert, die restlichen Verbliebenen besitzen jetzt allerdings ein deutlich größeres Volumen. In vereinzelten Fällen kann in diesem Stadium bereits eine Kompartimentierung des Chromatins festgestellt werden. Diese Beobachtungen passen sehr gut zu denen, die bereits 1979 von MOAN *et al.* bei der Untersuchung der photodynamischen Wirkung des Hämatoporphyrins gemacht wurden. Auch hier wurde das Auftreten von Blasen in der Plasmamembran nur wenige Minuten nach der Belichtung beschrieben.^[134] Neuere Studien von LANE *et al.* beschreiben dieses Verhalten als einen normalen Bestandteil der Apoptose adhärenter Zellen.^[135] Laut ihrer Arbeiten steht die Blasenbildung dabei in einem direkten Zusammenhang zum Ablösen der Zellen von ihrem Untergrund, welches kurz nach der Aktivierung der Caspasen beginnt. Als Auslöser dieser morphologischen Veränderung wird die stressaktivierte Umorganisation des Zytoskeletts vermutet.^[136,137] Dieser auch als Zeiose bezeichnete Prozess dauert für etwa 30-40 min an. Im Anschluss daran beschreiben LANE *et al.* eine zweite Phase der Blasenbildung, bei der sich weniger, dafür aber größere und weniger dynamische Blasen bilden.^[135] Diese Strukturen können als Vorläufer der späteren apoptotischen Körper gesehen werden, die das Endprodukt des programmierten Zelltods darstellen.

In Anbetracht dieser Studien deuten auch die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen auf das Auslösen eines apoptotischen Zelltods hin. Die Schnelligkeit, mit der dieser Prozess nach der Belichtung auftritt, verweist dabei zusätzlich auf eine photodynamische Wirkung, wie sie auch für Hämatoporphyrin und zahlreiche weitere Photosensibilisatoren bekannt ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, untersuchte KATHRIN WÄHLER in ihrer Doktorarbeit die Komplexe AW0234 und SEK030 auf ihre Fähigkeit zur lichtinduzierten Singulett Sauerstoff Produktion. Sie verwendete dabei eine leicht abgewandelte Methode von KRALJIĆ und EL MOHSNI^[138] zum Nachweis von $^1\text{O}_2$ in wässrigen Lösungen. Hierbei reagiert der kurzlebige $^1\text{O}_2$ zunächst mit Imidazol zu einem Endoperoxid, welches anschließend als Oxidationsmittel die Bleichung des redoxsensitiven Farbstoffs *para*-Nitrosodimethylanilin (RNO) verursacht. Aus der Differenz der gemessenen Absorptionswerte des RNOs bei 440 nm, vor und nach der Belichtung der Komplexe, können dann Rückschlüsse auf eine vorhandene oder nicht vorhandene Singulett Sauerstoff Produktion gezogen werden. Die in Abbildung 23 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl AW0234 als auch SEK030 unter Einfluss von sichtbarem Licht Singulett Sauerstoff generieren.^[139] Der nächste Schritt dieser Arbeit beschäftigte sich daher mit der Untersuchung, ob diese nachgewiesene Produktion von $^1\text{O}_2$ auch ursächlich für den beobachteten licht-induzierten zytotoxischen Effekt der Komplexe ist.

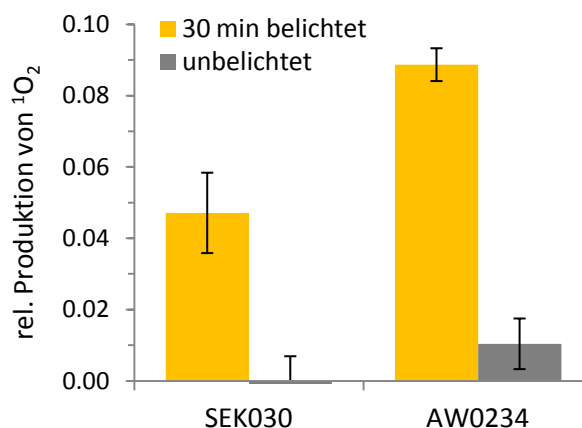


Abbildung 23: Nachweis der Entstehung von Singulett Sauerstoff infolge der Belichtung der Metallkomplexe AW0234 und SEK030. Beide Verbindungen wurden in einer Konzentration von 50 μM in einem 1:1 Gemisch aus PBS und DMSO zusammen mit 50 μM *para*-Nitrosodimethylanilin (RNO) und 8 mM Imidazol gelöst. Die Absorption des redoxsensitiven Farbstoffs RNO wurde sowohl vor als auch nach einer 30-minütigen Belichtung mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 505 \text{ nm}$) gemessen und die negative Differenz beider Werte als relative $^1\text{O}_2$ -Produktion angegeben. Die gezeigten Balken zeigen die Mittelwerte aus sechs einzelnen Datenpunkten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Da aufgrund der lipophilen Eigenschaft der Komplexe eine Lokalisation innerhalb der Zellmembran wahrscheinlich ist, wurde hierzu zunächst überprüft, welchen Einfluss die zusätzliche Gabe des ebenfalls lipophilen Antioxidans α -Tocopherol auf die Viabilität der Zellen besitzt. Diese, auch als Vitamin E bekannte Verbindung, lagert sich in den Membranen der Zelle an und verhindert dort oxidative Schäden durch Lipidperoxidation.^[140] Für den Versuch wurden die Zellen 24 h vor der Belichtung in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von α -Tocopherol ausplattiert. Eine Stunde vor der Belichtung wurde dem Kulturmedium dann zusätzlich 1 μM der Verbindung SEK030 oder AW0234 zugegeben. Die Kontrollergebnisse ohne α -Tocopherol zeigen eine Zellviabilität von 3.8 % (± 3.8) nach einer 30-minütigen Belichtung mit $\lambda \geq 505 \text{ nm}$ für die mit SEK030 behandelten Zellen (Abbildung 24). Bei einer gleichzeitigen Anwesenheit von 50 μM α -Tocopherol erhöht sich die Überlebensrate auf 26.2 % (± 14.5) und bei 200 μM liegt sie bereits bei 67.1 % (± 15.7). Wird die Konzentration ein weiteres Mal auf 400 μM verdoppelt, so erhöht sich die Zellviabilität nur noch geringfügig auf 75.3 % (± 5.5). Eine Konzentration von 10 μM des Antioxidans ist nicht ausreichend, um die Überlebensrate der Zellen maßgeblich zu steigern. Ähnliche Ergebnisse konnten auch für den Komplex AW0234 erzielt werden. Dieser wurde aufgrund seines niedrigeren Absorptionsmaximums mit einem Lichtspektrum von $\lambda \geq 415 \text{ nm}$ angeregt. In Anwesenheit von 200 μM α -Tocopherol erhöhte sich die Zellviabilität hier von 10.3 % (± 5.8) auf 71.6 % (± 12.8). Die Ergebnisse zeigen damit eine deutliche Reduktion des beobachteten lichtinduzierten zytotoxischen Effekts durch die Gabe von α -Tocopherol.

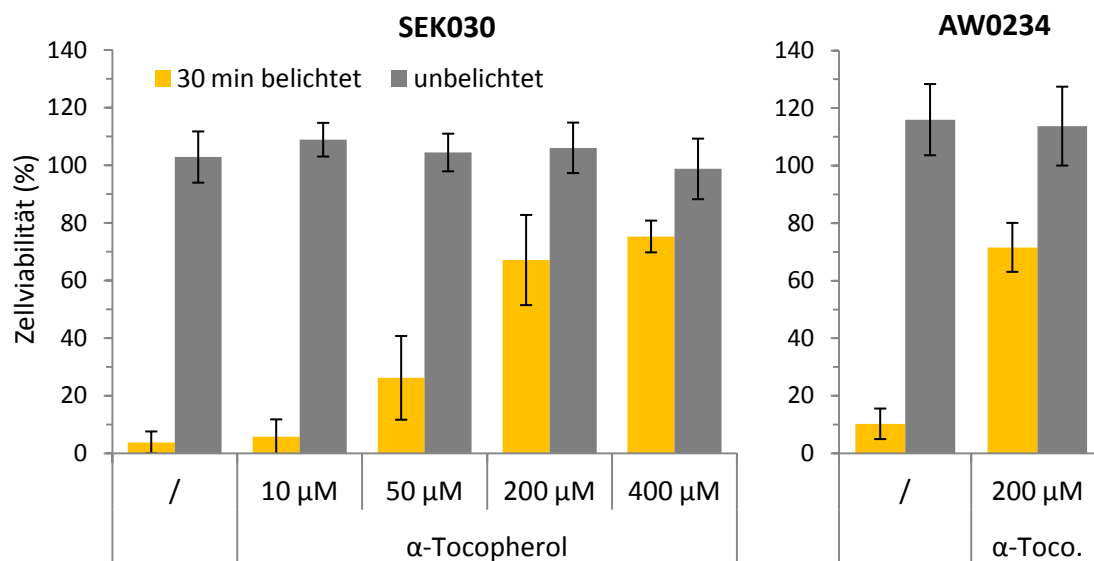


Abbildung 24: Inhibierung des lichtinduzierten zytotoxischen Effekts der Komplexe SEK030 und AW0234 durch den natürlichen $^1\text{O}_2$ -Fänger α -Tocopherol. Das Antioxidans wurde bereits 24 h vor der Belichtung dem Kulturmedium der HeLa-Zellen zugegeben. 1 h vor der Belichtung wurden die Zellen mit 1 μM der Verbindungen SEK030 oder AW0234 behandelt. Die anschließende 30-minütige Belichtung erfolgte mit einer Xe/Hg-Bogenlampe mit $\lambda \geq 505 \text{ nm}$ für die SEK030 behandelten Zellen und $\lambda \geq 415 \text{ nm}$ für die AW0234 behandelten. Die Zellviabilität wurde 24 h nach der Zugabe der Komplexe mittels MTT-Test bestimmt. Die gezeigten Balken geben den Mittelwert aus 18 Datenpunkten gemessen in zwei unabhängigen Versuchen an. Die Fehlerbalken zeigen die entsprechende Standardabweichung.

Als Membran-lokalisiertes Antioxidans ist α -Tocopherol dafür bekannt, 1000-mal schneller mit Peroxylradikalen der Membran zu reagieren als die benachbarten mehrfach ungesättigten Fettsäuren.^[141] Dadurch unterbricht es die extrem zellschädigende Reaktionskette der Lipidperoxidation. Als Auslöser dieser Kettenreaktion sind zum einen freie Radikale sowie auch Singulett Sauerstoff bekannt. Erstere verursachen, durch die Abstraktion eines Wasserstoffatoms aus der Kohlenstoffkette der Lipide, die Generierung eines Alkylradikals. Bei der anschließenden Reaktion mit O_2 entsteht dann das bereits erwähnte Peroxylradikal.^[80] Im Gegensatz dazu reagiert Singulett Sauerstoff direkt mit den Fettsäureketten der Lipide und erzeugt auf diesem Weg die reaktive Spezies. Einmal entstandene Peroxylradikale abstrahieren weitere Wasserstoffatome aus benachbarten ungesättigten Fettsäuren und setzen damit die zellschädigende Kettenreaktion der Lipidperoxidation fort. α -Tocopherol beendet diese Reaktion durch die Übertragung eines Wasserstoffatoms, wodurch es selbst zum Radikal und das Peroxylradikal zum Hydroperoxid wird.^[142] Aufgrund seiner Mesomeriestabilisierung ist das α -Tocopherolradikal deutlich weniger reaktiv als das Peroxylradikal und kann durch die weitere Reaktion mit Vitamin C regeneriert werden.^[141] Die Feststellung, dass α -Tocopherol die Photozytotoxizität von AW0234 und SEK030 vermindert, legt die Vermutung nahe, dass auch hier eine Membranschädigung durch Lipidperoxidation zugrunde liegt. Ob diese durch den $^1\text{O}_2$ selbst oder durch sekundär entstandene reaktive Spezies ausgelöst wird, lässt sich dabei nicht

beantworten. Allerdings ist damit der indirekte Beweis erbracht, dass die lichtinduzierte Generierung von $^1\text{O}_2$ durch die Komplexe AW0234 und SEK030 der Auslöser der beobachteten Photozytotoxizität ist.

Für einen direkten Nachweis wurde das Vorhandensein reaktiver Sauerstoffspezies in den Zellen nach der photoaktivierten Behandlung überprüft. Hierzu wurden die Zellen vor der Zugabe des Komplexes SEK030 mit dem Nachweisreagens 5-(und 6)-Carboxy-2',7'-difluorodihydrofluoresceindiacetat (Carboxy- H_2DFFDA) behandelt. Diese Verbindung wandelt sich nach ihrer Aktivierung durch zelluläre Esterasen und der Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies in den Fluoreszenzstoff Carboxy-DFF um, dessen Emission bei 527 nm nachgewiesen werden kann. Zwar ist Carboxy- H_2DFFDA kein direktes Nachweisreagens für $^1\text{O}_2$, aber es zeigt die Anwesenheit von Peroxiden und Peroxylradikalen an, welche aus den Reaktionen des Singulett Sauerstoffs mit seiner Umgebung hervorgehen. Die Ergebnisse in Abbildung 25 zeigen, dass weder die alleinige Bestrahlung mit Licht ($\lambda \geq 505$ nm für 45 min) noch die kombinierte Behandlung mit Licht und 1 μM SEK030 zu einer messbaren ROS-Produktion führen. Erst bei einer Konzentration von 30 μM lässt sich eine Steigerung in der Belastung der Zellen mit oxidativem Stress, um den Faktor vier, nachweisen. Dieses Ergebnis widerspricht den Erwartungen, da auch die Behandlung mit 1 μM SEK030 die Zellviabilität auf annähernd 0 % reduziert und ihr daher ein massiver oxidativer Stress in den Zellen zugrunde liegen sollte. Als Vergleich wurde eine Kontrolle mit dem starken Oxidationsmittel *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) durchgeführt. Dieses verursacht bei einer Konzentration von 200 μM eine vergleichbare Toxizität, mit einer Überlebensrate von 9.2 % in HeLa-Zellen, allerdings ist hier ein deutlicher Anstieg in der ROS-Belastung messbar. Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte sein, dass die durch SEK030 induzierte photodynamische Wirkung auf eine bestimmte lokale Position in der Zelle beschränkt ist, an der sie gezielt einen Schaden verursacht, der zum Zelltod führt. Die Konsequenz aus dieser Annahme wäre, dass eine deutlich geringere Konzentration reaktiver Spezies notwendig ist, um die Viabilität der Zellen einzuschränken, als das für den großflächig angreifenden ROS-Produzenten TBHP der Fall ist. Wie bereits die Experimente mit dem Peroxylradikalfänger α -Tocopherol gezeigt haben, scheinen die Komplexe eine Neigung zur Lokalisation in der Zellmembran zu besitzen. Eine gezielt dort verursachte oxidative Schädigung wäre daher unzugänglich für einen hydrophilen Nachweisstoff wie Carboxy- H_2DFFDA . Der gemessene oxidative Stress bei einer Konzentration von 30 μM SEK030 zeigt, dass die Verbindung in Kombination mit Licht grundsätzlich dazu in der Lage ist, ROS in den Zellen zu erzeugen. Es ist daher möglich, dass die Nachweisgrenze der reaktiven Spezies erst bei dieser Konzentration des Komplexes erreicht wird, obwohl der Zelltod auch bei deutlich geringeren Werten eintritt.

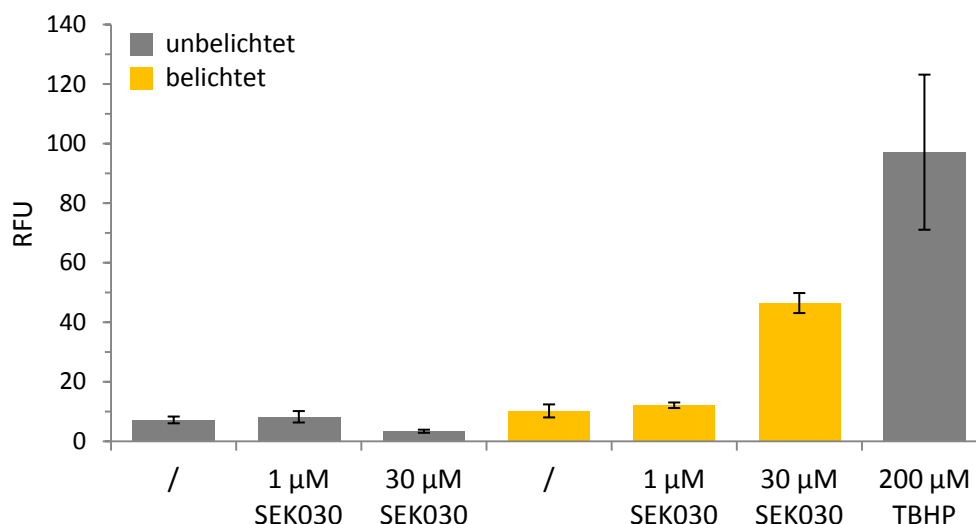


Abbildung 25: Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in HeLa-Zellen nach einer lichtaktivierten Behandlung mit SEK030. Vor der Behandlung mit dem Komplex wurden die Zellen für 1 h mit dem Nachweisreagens Carboxy-H₂DFFDA inkubiert und danach der gewohnten Phototherapie mit SEK030 und einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 505$ nm, Belichtungsdauer 45 min) unterzogen. Direkt im Anschluss an die Belichtung wurde das Fluoreszenzsignal des entstandenen Carboxy-DFF gemessen. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich die Reaktion der Zellen auf 200 µM *tert*-Butylhydroperoxid gemessen. Die Balken geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Unabhängig von der Sigulett Sauerstoff Generierung durch AW0234 konnte ALEXANDER WILBUER in seiner Doktorarbeit zeigen, dass der Selenocyanat-Ligand der Verbindung photolytisch dissoziiert und gegen einen verfügbaren Liganden wie Chlorid austauscht.^[143] Inwiefern diese Eigenschaft des Komplexes ebenfalls an der Photozytotoxizität der Verbindung beteiligt ist, konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden. Eine Messung der Zellviabilität nach der Gabe von 1 mM Kaliumselenocyanat ergab keine Toxizität für den frei gewordenen Liganden. Als mögliche Option bleibt daher nur ein toxischer Effekt durch das verbliebene Iridium-Kation oder ein aus einer Sekundärreaktion hervorgegangenes Photoprodukt. Allerdings existiert momentan kein konkreter Anhaltspunkt für mögliche Angriffsziele dieser potentiell toxischen Spezies oder deren Einfluss auf die Zellviabilität.

Auch für den Komplex SEK030 wurde zu Beginn der Untersuchungen ein photodissoziativer Prozess von einem der CO-Liganden nicht ausgeschlossen. Wie sich herausstellte, wird aber lediglich der Pyridinligand unter Anwesenheit eines geeigneten Austauschpartners, wie 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP), aus seiner Bindung verdrängt.^[144] Dieser Prozess ist unter Lichteinfluss doppelt so schnell wie im Dunkelexperiment. Allerdings konnte auch in diesem Fall kein toxischer Effekt des freien Liganden beobachtet werden. Die Photoinstabilität der Komplexe AW0234 und SEK030 ist ein Problem, nicht nur für die eindeutige Zuordnung des zytotoxischen Effekts. Auch in Bezug auf einen möglichen *in vivo* Einsatz macht eine solche Eigenschaft den

Wirkstoff unberechenbar. An einem späteren Teil dieser Arbeit wird daher erneut auf das Thema Stabilität eingegangen.

Klar ausgeschlossen werden konnte ein Einfluss der Kinase-inhibierenden Eigenschaft der Komplexe AW0234 und SEK030 auf den photozytotoxischen Effekt. Dies zeigen bereits Versuche aus meiner Masterarbeit, bei denen eine Variante des Komplexes AW0234 mit einer Methylschutzgruppe am Maleimid untersucht wurde. Diese Schutzgruppe verhindert die Bindung des Komplexes in der Aktiventasche der Kinase, nicht aber seine photozytotoxische Aktivität.^[143] Daraus kann geschlossen werden, dass die Kinaseinhibition und der lichtinduzierte Effekt auf zwei unabhängigen Eigenschaften der Verbindung beruhen. Der gleiche Nachweis wurde auch für den Komplex SEK030 im Zuge dieser Doktorarbeit durchgeführt (siehe Abbildung 43).

Zusammengefasst haben die Ergebnisse dieses Abschnitts gezeigt, dass die lichtinduzierte Zytotoxizität der Komplexe AW0234 und SEK030 auf eine photodynamische Wirkung zurückzuführen ist, wie sie auch für die Photosensibilisatoren der PDT bekannt ist. Dies haben die gemessene lichtabhängige $^1\text{O}_2$ -Produktion sowie die Aufhebung der Toxizität durch α -Tocopherol ergeben. Untermauert werden diese Resultate durch die *xCELLigence* Messungen sowie die Fluoreszenzmikroskopie. Die dort beobachtete schnelle Reaktion der Zellen auf die Behandlung, stimmt in vielen Punkten mit der beschriebenen apoptotischen Reaktion von Zellen in der PDT überein. Des Weiteren geben die Ergebnisse erste Hinweise auf eine Lokalisation der Komplexe in der Zelle. Die Tatsache, dass der in der Membran der Zellen sitzende Radikalfänger α -Tocopherol die toxische Wirkung der Komplexe deutlich verringert, während ein Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies im Zytosol bei gleicher Komplexkonzentrationen nicht möglich ist, deutet auf eine Lokalisation in oder an der Membran hin.

3.3 Untersuchung des Zelltods infolge der photodynamischen Behandlung mit SEK030

Die in den letzten beiden Abschnitten dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass die photodynamische Behandlung mit dem Komplex SEK030 zu einem Verlust der Viabilität verschiedener Krebszelllinien führt. Die zellulären Mechanismen, die hierbei an der Einleitung des Zelltods beteiligt sind, waren ebenfalls Bestandteil der Untersuchungen dieser Arbeit.

In der Biologie wird zwischen zwei Formen des Zelltods unterschieden. Bei der Nekrose, die hauptsächlich nach Infektionen oder Verletzungen auftritt, wird die Membran der Zellen zerstört und das Zytoplasma kann unkontrolliert austreten. Dies hat zur Folge, dass normalerweise in der Zelle eingeschlossene Moleküle, wie DNA oder Stressproteine, in den extrazellulären Raum gelangen und dort eine Entzündungsreaktion verursachen. Im Gegensatz dazu läuft die Apoptose

(programmierter Zelltod) kontrolliert und erst nach der Aktivierung extra- oder intrazellulärer Signale ab. Das Endprodukt dieses Prozesses sind die so genannten apoptotischen Körper, die als membranumschlossene Vesikel den abgebauten Zellinhalt in sich tragen und von phagozytierenden Zellen des Immunsystems abgebaut werden. Da infolge einer photodynamischen Behandlung sowohl das Auftreten des nekrotischen als auch des apoptotischen Zelltods bekannt ist^[82], wurden SEK030 behandelte HeLa-Zellen auf verschiedene Charakteristika der Apoptose untersucht.

DNA-Fragmentierung

Eine dieser spezifischen Eigenschaften der Apoptose ist die Fragmentierung der nukleären DNA. Hierzu wurde diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) angefärbt und ihr Gehalt in den isolierten Zellkernen mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Im Anschluss wurde der gemessene DNA-Gehalt den einzelnen Phasen des Zellzyklus zugeordnet. Apoptotische Zellen können daran erkannt werden, dass ihr DNA-Gehalt unterhalb des normalen diploiden Chromosomensatzes liegt, da die durch DNasen entstandenen DNA-Fragmente aus dem Nukleus hinaus diffundieren. Zellkerne mit dieser Eigenschaft wurden in der sub-G1 Phase zusammengefasst. Die Ergebnisse in Abbildung 26 zeigen keine signifikante Veränderung in der Aufspaltung der Zellzyklusphasen zwischen unbelichteten (23.1 % G2/M; 8.4 % S; 58.0 % G1; 5.8 % sub-G1) und belichteten Kontrollzellen (22.8 % G2/M; 8.8 % S; 57.7 % G1; 6.3 % sub-G1).

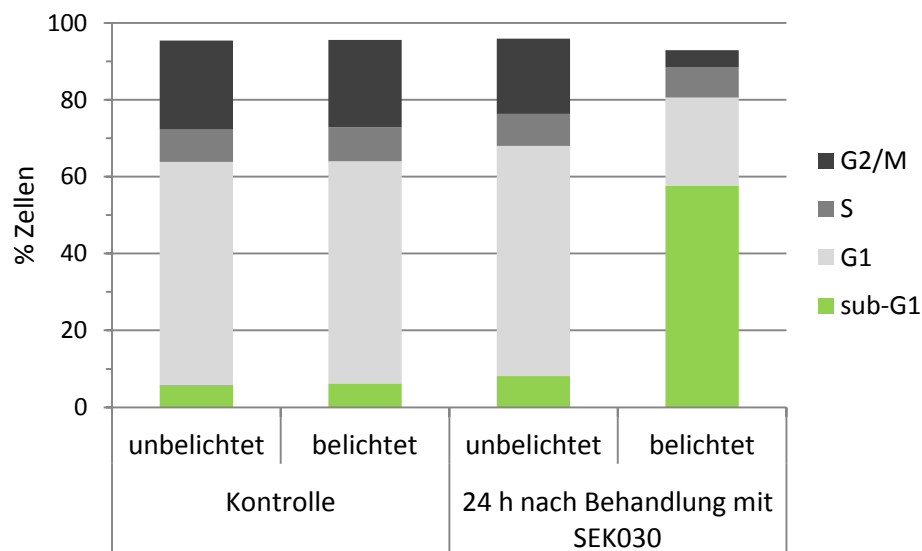


Abbildung 26: Zellzyklusanalyse photodynamisch behandelter HeLa-Zellen 24 h nach der Zugabe von 1 μM SEK030 und der Belichtung mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 505 \text{ nm}$, Belichtungszeit 1 h). Die DNA wurde mittels einer PI-Lösung angefärbt und ihr Gehalt im Nukleus mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmten Zellzyklusstadien zugeordnet. Die dargestellten Ergebnisse sind gemittelte Werte vier einzelner Datenpunkte aus zwei unabhängigen Messungen.

Erst nach der zusätzlichen Behandlung mit 1 μM SEK030 ergibt sich ein klarer Anstieg in der sub-G1 Phase bei den belichteten Zellen nach 24 h (unbelichtet: 19.6 % G2/M; 8.3 % S; 59.9 % G1; 8.1 % sub-G1; belichtet: 4.5 % G2/M; 7.9 % S; 22.8 % G1; 57.7 % sub-G1). Dieser drastische Anstieg in der DNA-Fragmentierung ist ein Hinweis für das Stattfinden eines apoptotischen Zelltods. Allerdings ist er kein absolutes Ausschlusskriterium für die Nekrose, da auch hier zu einem gewissen Grad hypodiploide Zellkerne auftreten können.^[145] Aus diesem Grund wurde in weiteren Versuchen die Aktivität verschiedener Caspasen nach der photodynamischen Behandlung gemessen.

Nachweis aktiver Caspasen

Aktive Caspasen sind ein fester Bestandteil apoptotischer Zellen und maßgeblich an der Einleitung und Umsetzung des zellulären Abbaus beteiligt. Ihre Funktion besteht darin, diverse Proteine der Zelle zu spalten und auf diesem Weg zu zerstören oder auch zu aktivieren, wie im Fall der Caspase-aktivierten DNase (CAD).^[146] Der Nachweis aktiver Caspasen ist daher ein eindeutiger Beweis für das Auftreten der Apoptose. Bereits in meiner Masterarbeit wurde eine Verdopplung der Aktivität der Caspasen 3 und 7 in HeLa-Zellen nach einer lichtaktivierten Behandlung mit AW0234 festgestellt.^[131] Der gleiche Nachweis mit der Verbindung SEK030 ergab einen Aktivitätsanstieg um den Faktor 5.7 im Vergleich zu unbelichteten oder komplett unbehandelten Zellen (Abbildung 27).

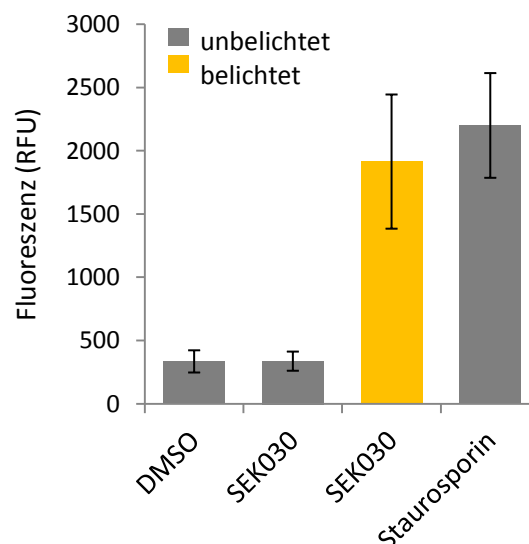


Abbildung 27: Nachweis der Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit dem Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega). Die mit 1 μM SEK030 behandelten HeLa-Zellen wurden für 1 h im Dunkeln inkubiert und anschließend für 30 min mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 505 \text{ nm}$) belichtet. 5 h nach der Belichtung wurde das Nachweisreagens Z-DEVD-R110 zugegeben. Als Positivkontrolle wurden die Zellen für 5 h mit 1 μM des Apoptose-induzierenden Kinaseinhibitors Staurosporin inkubiert. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Damit ist bewiesen, dass der Verlust der Viabilität durch die lichtaktivierte Behandlung mit den Komplexen AW0234 und SEK030 in HeLa-Zellen, zumindest zu einem gewissen Teil, auf eine Einleitung des apoptotischen Zelltods zurückzuführen ist. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der gemessenen Fragmentierung der DNA sowie den morphologischen Veränderungen der Zellen, die im letzten Kapitel beschrieben wurden. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass veränderte Bedingungen, wie höhere Konzentrationen oder Lichtdosen, zu einem verstärkten Auftreten von Nekrose führen. Des Weiteren lässt sich keine Aussage darüber machen, inwiefern nekrotische Zellen zusätzlich zur festgestellten Apoptose auftreten.

Die nachgewiesenen Caspasen 3 und 7 sind Effektor-Caspasen, die direkt durch die Initiator-Caspasen 8 oder 9 aktiviert werden. Welche der beiden dabei als Aktivator fungiert, hängt bei der Photodynamischen Therapie hauptsächlich von der Lokalisation des Photosensibilisators ab.^[97] Wie in der Einleitung bereits beschrieben, führen in den Mitochondrien lokalisierte Wirkstoffe zur Ausschüttung des Proteins Cytochrom c, welches als Signalstoff die Aktivierung der Procaspase 9 induziert.^[81] Dieser Weg wird im Allgemeinen auch als intrinsischer Apoptosevorgang bezeichnet. Im Gegensatz dazu wird die Procaspase 8 normalerweise über den extrinsischen Signalweg, durch die TNF- und Fas-Rezeptoren der Plasmamembran, aktiviert. Um genauere Informationen über den Apoptosesignalweg sowie eine mögliche Lokalisation der Komplexe in der Zelle zu erhalten, wurden weitere Versuche durchgeführt. Eine erste Messung der Caspase 8 Aktivität 5 h nach der Belichtung SEK030-behandelter HeLa-Zellen ergab einen Anstieg um den Faktor 3.0 verglichen mit komplett unbehandelten Zellen. Im Vergleich zu belichteten Zellen, die nicht mit dem Komplex behandelt wurden, fand eine Verdopplung der Aktivität (Faktor 2.2) statt (Abbildung 28a). Dieses Ergebnis zeigt eine deutliche Steigerung in der Caspase 8 Aktivität und spricht daher zunächst für das Auftreten einer extrinsisch vermittelten Apoptose. Allerdings ist das nicht die einzige denkbare Erklärung. Wie einige Studien beweisen, ist auch eine alternative, rückgekoppelte Aktivierung der Caspase 8 durch die Caspase 3 möglich.^[87,147,148] Die alleinige Feststellung einer aktiven Caspase 8 lässt daher noch keine Rückschlüsse über den ursprünglichen Auslöser der Apoptose zu. Deshalb wurde in weiteren Versuchen der zeitliche Ablauf des Vorgangs untersucht (Abbildung 28). Die Ergebnisse zeigen, dass die Caspase 8 erstmals 2.5 h nach der Belichtung der Zellen einen merklichen Anstieg in ihrer Aktivität hat. Die gemessene Lumineszenz des Nachweisreagens erhöht sich hierbei um den Faktor 1.6, verglichen mit den belichteten Kontrollzellen ohne SEK030. 5 h nach der Belichtung ist, wie bereits beschrieben, eine Verdopplung der Aktivität erreicht. Im Vergleich dazu, sind die Caspasen 3 und 7 bereits im direkten Anschluss an die 30-minütige Belichtung aktiv, wie eine Steigerung des Lumineszenzsignals um den Faktor 2.1 beweist.

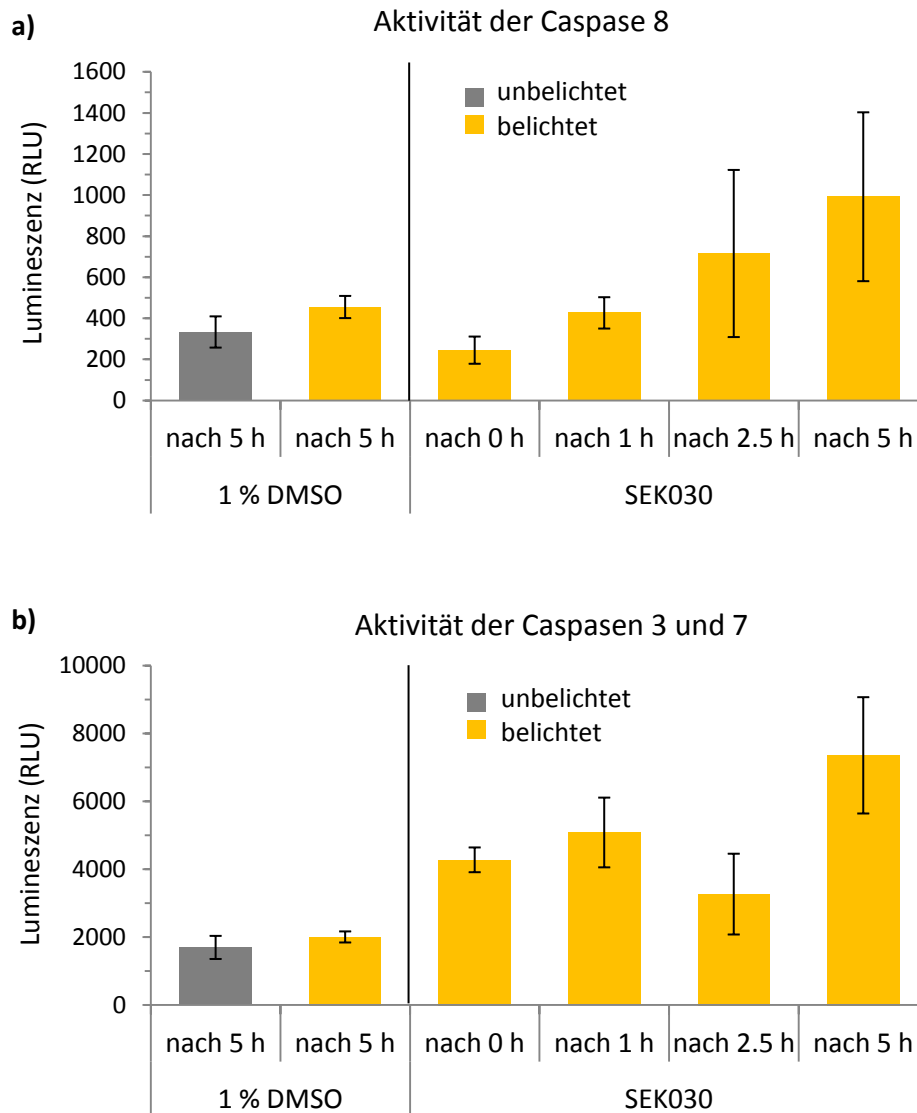


Abbildung 28: Zeitabhängige Bestimmung der Caspaseaktivität mit Hilfe der Caspase-Glo Methode von Promega. Die mit $1 \mu\text{M}$ SEK030 behandelten HeLa-Zellen wurden für 1 h im Dunkeln inkubiert und anschließend für 30 min mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 505 \text{ nm}$) belichtet. 0, 1, 2.5, und 5 h nach der Belichtung wurde die Inkubation durch die Zugabe des Caspase-Glo Nachweisreagens abgebrochen und die Caspaseaktivität durch die Messung der Lumineszenz bestimmt. Die Ergebnisse in **a)** basieren auf sechs Datenpunkten aus zwei unabhängigen Messungen, die Ergebnisse in **b)** basieren auf drei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Nach einer Stunde ist ein Faktor von 2.5 im Vergleich zur belichteten Kontrolle erreicht. Interessanter Weise fällt die Aktivität nach 2.5 h etwas ab, auf nur noch den 1.6-fachen Wert der Kontrolle. 5 h nach der Belichtung nimmt sie dann jedoch wieder zu und erreicht die 3.7-fache Stärke des Lumineszenzsignals der Kontrollmessung. Damit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 eindeutig der Aktivierung der Caspase 8 vorausgeht. Für die Interpretation der zellulären Ereignisse nach der photodynamischen Behandlung mit SEK030 bedeutet dies, dass eine Einleitung der Apoptose über den TNF- oder Fas-Rezeptor vermittelten

extrinsischen Signalweg ausgeschlossen werden kann. Nach dem Ausschlussprinzip bleibt daher nur die Möglichkeit des intrinsischen, Mitochondrien-vermittelten Wegs bestehen.

Verlust des mitochondrialen Membranpotentials

Um weitere Hinweise zu erhalten, wurde das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) der Zellen untersucht. Mitochondrien besitzen aufgrund der in der Atmungskette vorhandenen Protonenpumpen einen starken H^+ -Gradienten über ihrer inneren Membran. Dieser ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Energieversorgung der Zelle. Ein Zusammenbruch dieses Gradienten ist ein charakteristisches Merkmal der Apoptose sowie auch eine bekannte Folge der PDT. Für einige, in den Mitochondrien lokalisierte, Photosensibilisatoren ist der Verlust von $\Delta\Psi_m$ eines der ersten Ereignisse, das nach der Belichtung der Zellen eintritt.^[82] Die Ursache dieses Zusammenbruchs ist noch nicht eindeutig geklärt. Einige Studien deuten jedoch auf eine Öffnung des PTP-Komplexes hin.^[89] Findet ein solcher Verlust des mitochondrialen Membranpotentials statt, so ist dieser immer mit der Ausschüttung des Procaspase 9 aktivierenden Proteins Cytochrom c verbunden. Umgekehrt kann eine Cytochrom c Ausschüttung jedoch auch ohne den Verlust von $\Delta\Psi_m$ auftreten. Dies ist besonders bei niedrigeren Konzentrationen oder Lichtdosen der Fall.^[149]

Um festzustellen, ob auch die photodynamische Behandlung mit SEK030 zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt und dadurch eine Erklärung für die aktiven Caspasen liefert, wurden Versuche mit dem lipophilen, kationischen Farbstoff 3,3'-Dihexyloxacarbocyanin (DiOC6) durchgeführt. Dieser lagert sich in einer $\Delta\Psi_m$ -abhängigen Weise in den Mitochondrien an und gibt auf diese Art Auskunft über die Intaktheit des Potentials. Für den Versuch wurden kultivierte HeLa-Zellen drei und fünf Stunden nach der Behandlung mit $1\ \mu M$ SEK030 und einer einstündigen Belichtung mit $\lambda \geq 505\ nm$ mit DiOC6 angefärbt und das Fluoreszenzsignal der einzelnen Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen.

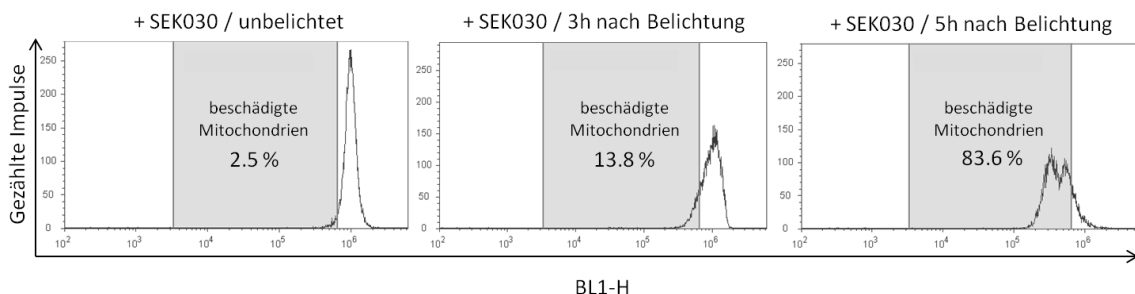


Abbildung 29: Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) in lichtaktivierten, SEK030-behandelten HeLa-Zellen. Die mit $1\ \mu M$ SEK030 behandelten Zellen wurden 1 h im Dunkeln inkubiert und anschließend für 1 h mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 505\ nm$) belichtet. 3 und 5 h nach der Belichtung wurden die Zellen geerntet und mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiOC6 angefärbt. Die Messung und Auswertung der Fluoreszenzsignale fand mit Hilfe der Durchflusszytometrie statt.

Die Ergebnisse in Abbildung 29 zeigen ein weitestgehend intaktes mitochondriales Membranpotential für die Kontrollzellen, die zwar mit SEK030 behandelt wurden, jedoch unbelichtet blieben. Lediglich 2.5 % der Zellen weisen hier ein Fluoreszenzsignal unterhalb der als kritisch festgelegten Grenze auf. Für komplett unbehandelte Zellen liegt der Wert bei 1.9 % (nicht graphisch dargestellt). 3 h nach der Belichtung steigt der Anteil der Zellen mit beschädigten Mitochondrien bereits leicht an auf 13.8 %. Ein eindeutiger Hinweis auf den Verlust von $\Delta\Psi_m$ lässt sich allerdings erst 5 h nach der Belichtung feststellen, wenn 83.6 % der Zellen ein reduziertes Fluoreszenzsignal zeigen. Aufgrund der zeitlichen Differenz zwischen dem Zusammenbruch des Membranpotentials und der Aktivierung der Caspaen 3 und 7, scheint dieser Vorgang jedoch nicht in Verbindung mit der Einleitung der Apoptose zu stehen. Die hierfür notwendige Ausschüttung des Cytochroms c muss daher bereits früher und unabhängig vom Zusammenbruch von $\Delta\Psi_m$ stattfinden. Es ist deshalb wahrscheinlicher, dass der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials lediglich eine Folge des programmierten Zelltods und nicht sein Auslöser ist.

Lokalisation

Eine bislang nicht betrachtete Ursache der Apoptose, die ebenfalls aus der PDT bekannt ist, ist die Zerstörung der Lysosomen. Hierbei schädigen endosomal aufgenommene Photosensibilisatoren die Membran dieses Organells und verursachen die Freisetzung der in ihm eingeschlossenen Proteasen. Diese sind dazu in der Lage pro-apoptotische Faktoren, wie Bid oder möglicherweise auch Procaspasen, auf direktem Weg zu spalten und dadurch die intrinsische Apoptosekaskade einzuleiten.^[92–94] Weiterführende Arbeiten von KATHRIN WÄHLER und RAIMO HARTMANN zur zellulären Lokalisation von SEK030 schließen jedoch die hierfür notwendige Co-Lokalisation des Komplexes mit den Endosomen oder Lysosomen aus (Abbildung 31a). Dies bedeutet gleichzeitig, dass keine Aufnahme der Komplexe über den endosomalen Transportweg erfolgt. Für die Durchführung der Versuche wurde der Komplex SEK030 über einen Linker mit einem Biotinmolekül gekoppelt (Abbildung 30) und anschließend durch eine Immunfärbung in den Zellen nachgewiesen. Neben den Endosomen und Lysosomen wurden weitere Zellbestandteile, wie die Plasmamembran, die Mitochondrien und der Zellkern, angefärbt (Abbildung 31b). Die Überlagerung der einzelnen Färbungen und die Durchführung von Korrelationsrechnungen ergaben dabei eine gewisse Co-Lokalisation des Komplexes mit den Mitochondrien und der Plasmamembran. Ausgeschlossen werden kann hingegen eine Anlagerung der Verbindung im Zellkern.

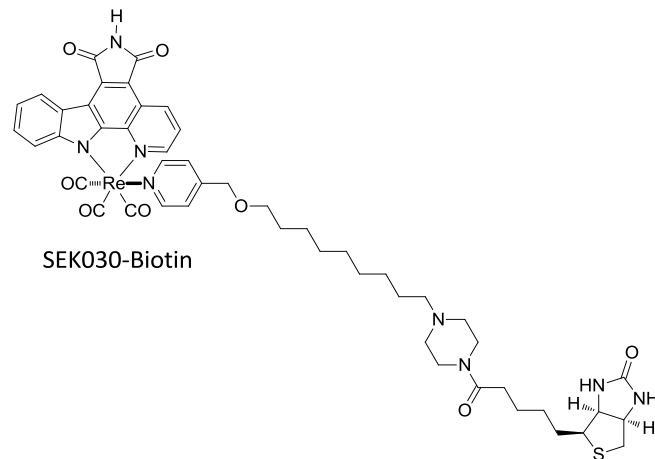


Abbildung 30: Struktur des Biotin-markierten Komplexes SEK030 für die Lokalisation in HeLa-Zellen.

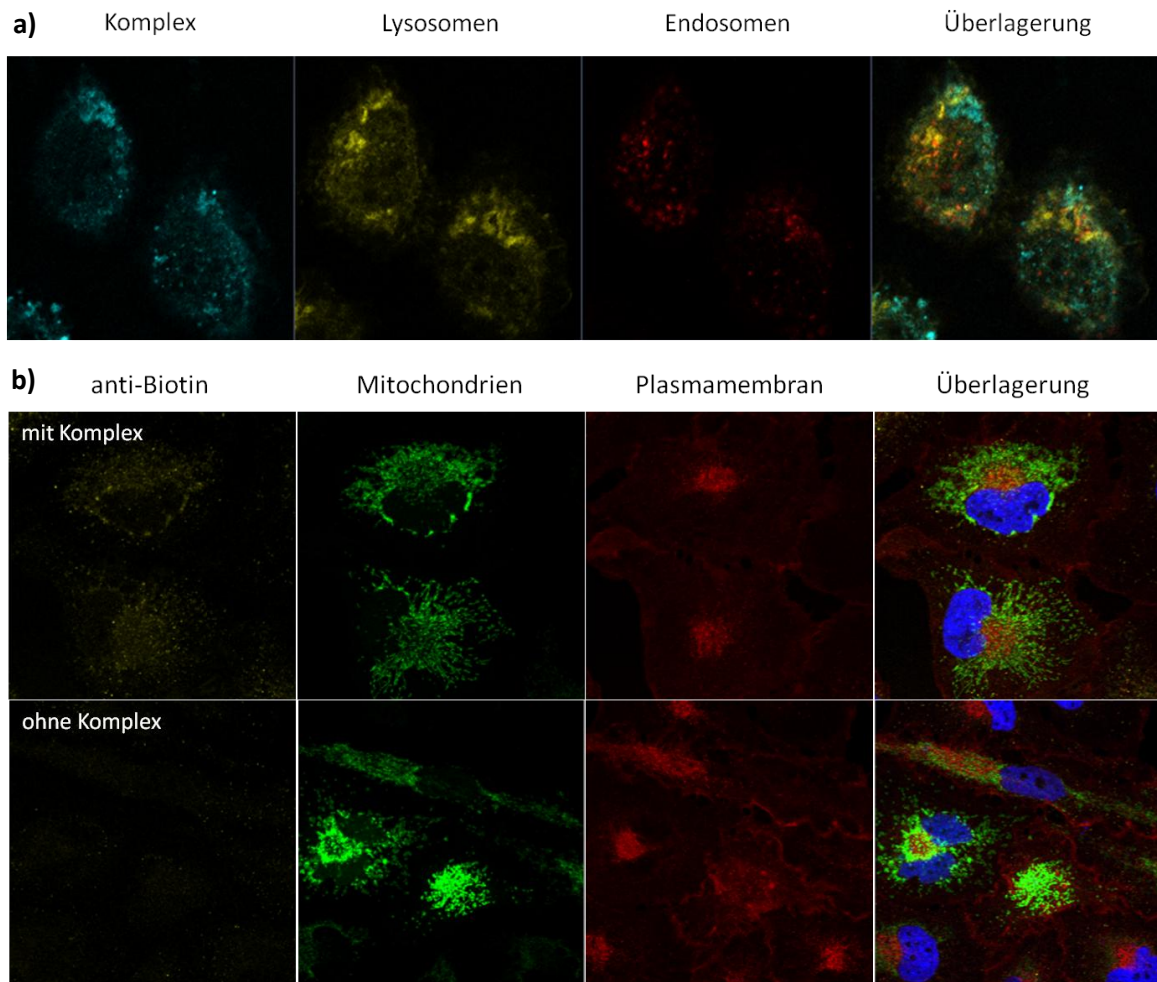


Abbildung 31: Versuchte Co-Lokalisation des Komplexes SEK030 mit verschiedenen Zellorganellen. Für den Versuch wurde eine Biotin-markierte Variante des Komplexes (1 μ M) für 24 h mit kultivierten HeLa-Zellen inkubiert. Anschließend wurde die Verbindung mit einer gegen das Biotin gerichteten Immunfärbung sichtbar gemacht. Neben dem Komplex wurden in **a)** die Endosomen und Lysosomen mit Hilfe der CellLight BacMam 2.0 Methode von Life Technologies angefärbt. In **b)** wurden die Mitochondrien mit dem CellLight Mitochondria-GFP BacMam 2.0 Reagens von Life Technologies angefärbt sowie die Plasmamembran mit WGA-TMR und der Zellkern mit DAPI. Die Bilder wurden mit einem 63 \times Objektiv an einem Laser Scanning Mikroskop (LSM 510 META, Carl Zeiss) aufgenommen.

Zusammengefasst ergeben die Ergebnisse dieses Abschnitts ein grobes Bild dessen, was infolge der photodynamischen Behandlung mit SEK030 in den kultivierten Zellen passiert. Fest steht, dass ein großer Teil von ihnen den apoptotischen Zelltod erleidet. Dies haben zahlreiche Merkmale, wie die Fragmentierung der DNA, die Bildung von Blasen in der Membran, das Schrumpfen der Zellen sowie der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und die Aktivierung der Caspasen 3, 7 und 8 gezeigt. Die Tatsache, dass eine Aktivierung des extrinsischen Signalwegs über die Caspase 8 nach dem jetzigen Wissensstand ausgeschlossen werden kann, deutet des Weiteren auf eine Mitochondrien-vermittelte intrinsische Apoptose hin. Ein entscheidender Nachweis hierfür wäre die bislang nicht durchgeführte Messung der Cytochrom c Ausschüttung nach der photodynamischen Behandlung. Ein bekannter Auslöser des intrinsischen Apoptosewegs ist die massive Schädigung der nukleären DNA. Da der Komplex SEK030 jedoch nachweislich nicht im Zellkern lokalisiert ist, kann diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. Ein weiteres Indiz hierbei ist die Schnelligkeit mit der die Aktivierung der Caspasen nach der Belichtung erfolgt und die auf eine sehr direkte Einleitung des Zelltods hinweist. Des Weiteren kann die Zerstörung der Lysosomen, als Auslöser des Mitochondrien-vermittelten Signalwegs, ausgeschlossen werden. Dies geht ebenfalls aus den Lokalisations-experimenten hervor.

Wie genau es zur Aktivierung der Apoptose kommt kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Vieles deutet darauf hin, dass sich die Verbindung bevorzugt in der Plasmamembran oder den Membranen der Organelle anlagert. Dies hat besonders die unterdrückende Wirkung des α -Tocopherols gezeigt. Des Weiteren lässt die nachgewiesene, wenn auch nur geringe, Lokalisation des Komplexes in den Mitochondrien die Schlussfolgerung zu, dass eine direkte Schädigung dieses Organells als Auslöser der Apoptose möglich ist. Eine Hypothese hierzu, die die bislang gemachten Beobachtungen in sich vereint, könnte wie folgt aussehen: Der lipophile Komplex SEK030 gelangt durch Diffusion in die Zelle und lagert sich dort zu einem gewissen Teil in der Mitochondrienmembran an. Durch die Belichtung entsteht $^1\text{O}_2$, der die ungesättigten Fettsäuren der Membran angreift und die Kettenreaktion der Lipidperoxidation in Gang setzt. Durch einen unbekannten Mechanismus kommt es zur Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ohne dabei das Membranpotential zu zerstören. Das Cytochrom c bindet an einen Komplex aus APAF-1 und Procaspase 9, was zur Aktivierung der Caspase führt. Diese aktiviert im folgenden Schritt die Effektor-Caspasen 3 und 7 und startet damit den programmierten Abbau der Zelle. Für die Mehrzahl der Photosensibilisatoren aus der PDT ist eine solche Lokalisation in den Mitochondrien bekannt. Dies erklärt auch die schnelle Reaktionszeit von der Belichtung bis zum Auftreten der ersten apoptotischen Eigenschaften.

Allerdings sind auch hier die einzelnen Schritte, die zur Einleitung des Zelltods führen, noch nicht in allen Details geklärt. Als mögliche Ursache für die Ausschüttung des Cytochroms c werden unter anderem Wechselwirkungen mit dem PTP-Komplex, den Mitgliedern der Bcl-2 Proteinfamilie und den Cardiolipinen diskutiert.^[150] Letztere sind speziell in der Mitochondrienmembran vorhandene Lipide, die einen Teil des Cytochroms c gebunden halten. In einer Stresssituation kann das Cardiolipin zum Peroxid oxidiert werden und dabei das Cytochrom c freigegeben.^[151] Eine solche Oxidation wurde unter anderem im Zusammenhang mit der PDT durch ALA und Pc 4 beobachtet.^[70,152] Ob eine dieser Möglichkeiten auch der Auslöser der SEK030-induzierten Apoptose ist oder, ob das Signal für den Zelltod an einer ganz anderen Stelle entsteht, müssen weiterführende Arbeiten klären. Ebenfalls möglich nach dem derzeitigen Kenntnisstand wäre eine Signalkaskade die von der Plasmamembran ausgeht und z.B. die Aktivierung der dort lokalisierten Phospholipase C einschließt. Auch dieser Weg ist in der PDT bekannt und führt zu einer massiven Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem ER und der anschließenden Permeabilisierung der Mitochondrienmembran.^[95]

3.4 Struktur-Aktivitäts-Beziehung und Optimierung von SEK030

Bei der Entwicklung eines bioaktiven Wirkstoffs ist es entscheidend, die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Strukturelementen und deren Einfluss auf die Aktivität genau zu kennen. Nur dann ist es möglich, eine Optimierung von Struktur und gewünschtem Effekt zu erreichen. Dies gilt auch für die in dieser Arbeit untersuchten Komplexe AW0234 und SEK030. Allerdings beschränkt sich der folgende Abschnitt ausschließlich auf die Struktur-Aktivitäts-Beziehung des letzteren Komplexes, da die Verbindung AW0234 aufgrund ihrer sehr aufwendigen Synthese von vornherein für eine weitere Optimierung ausgeschlossen wurde.

Struktur-Aktivitäts-Beziehung des Pyridocarbazol-Liganden

Zur Klärung der beschriebenen Zusammenhänge wurde zunächst der Einfluss des Übergangmetalls auf die Aktivität der Komplexe untersucht. Hierzu wurde die photodynamische Wirkung des freien Pyridocarbazol-Liganden ohne Metallzentrum bestimmt. Wie sich herausstellte, besitzt der freie Ligand zwar eine toxische Wirkung auf HeLa-Zellen, diese ist aber unabhängig von einer Belichtung. Die gemessene Zellviabilität beträgt 51.1 % (± 3.4) nach einer 15-minütigen Belichtung mit $\lambda \geq 330 \text{ nm}$ und 51.8 % (± 5.6) nach einer Inkubation im Dunkeln bei einer Konzentration von 1 μM Pyridocarbazol (Abbildung 32). Dieser toxische Effekt steht mit hoher Wahrscheinlichkeit im Zusammenhang mit der bereits bekannten Bindung des, als Pharmakophorligand entwickelten, Pyridocarbazols im aktiven Zentrum diverser Proteinkinasen.

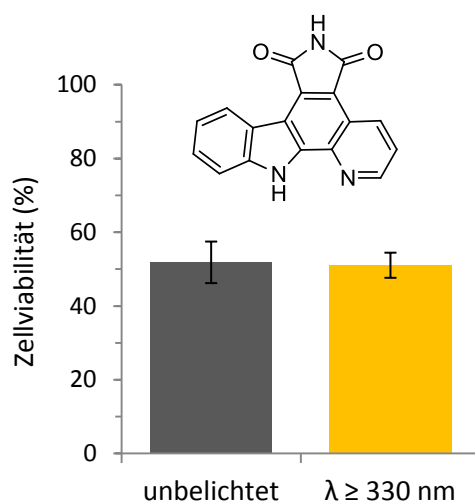


Abbildung 32: Gemessener Einfluss des freien Pyridocarbazol-Liganden auf die Viabilität von kultivierten HeLa-Zellen mit und ohne Belichtung. 1 h nach der Zugabe von $1 \mu\text{M}$ des Liganden zum Kulturmedium wurde ein Teil der Zellen für 15 min mit einer Xe/Hg-Bogenlampe belichtet ($\lambda \geq 330 \text{ nm}$). 24 h nach der Zugabe wurde dann die Viabilität mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus 18 Datenpunkten, die in zwei unabhängigen Experimenten bestimmt wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Eine erste gewonnene Erkenntnis ist daher, dass das Metall ein essentieller Bestandteil des photoaktiven Komplexes ist. Für seine Wahl stehen nach den Erfahrungen dieser Arbeit verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Wie bereits gezeigt wurde, kann die Koordination eines Iridiums oder Rheniums zu Komplexen mit einer photodynamischen Wirkung führen. Daneben wurde auch für den in Abbildung 33 dargestellten Ruthenium-Komplex SW010a eine lichtaktivierte Zytotoxizität gemessen. Die gemessene Zellviabilität beträgt in diesem Fall 8.7 % nach einer 60-minütigen Belichtung mit einem LED-Reflektor ($\lambda \geq 400 \text{ nm}$) und 101.9 % nach einer Inkubation im Dunkeln. Keine photodynamische Wirkung konnte bislang für Rhodium-Pyridocarbazol-Komplexe nachgewiesen werden.

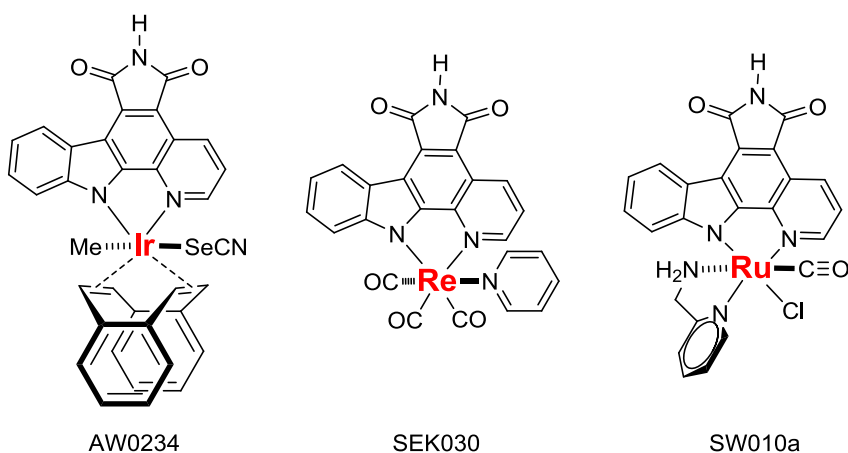


Abbildung 33: Photozytotoxische Pyridocarbazol-Komplexe mit verschiedenen Übergangsmetallen.

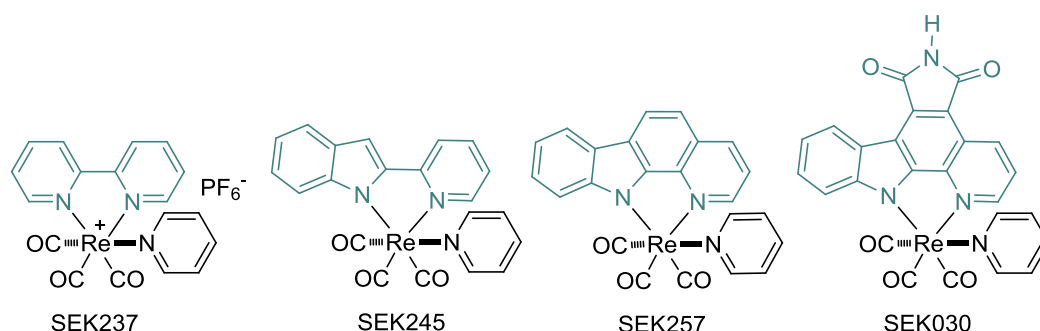


Abbildung 34: Schrittweiser Aufbau des Pyridocarbazol-Liganden von SEK030 ausgehend von dem einfach geladenen 2,2'-Bipyridin-Komplex SEK237.

In weiteren Versuchen wurden die einzelnen Strukturelemente des Pyridocarbazols genauer auf ihren Beitrag zum beobachteten photozytotoxischen Effekt untersucht. Hierzu wurde das Grundgerüst des Liganden von SANDRA DIECKMANN stückweise bis zu dem literaturbekannten Bipyridin-Komplex SEK237^[153,154] verkleinert (Abbildung 34).^[155] Dieser Schritt hat deutliche Auswirkungen auf das Absorptionsverhalten der Komplexe gezeigt (Abbildung 35a).^[155] Wie zu erwarten, verschieben sich die Absorptionsmaxima mit der zunehmenden Größe des aromatischen Ringsystems in den längerwelligen Bereich. Ausgehend von einem Maximum bei 323 nm für den 2,2'-Bipyridin-Komplex, liegt die maximale Absorption für den Pyridylindol-Komplexes SEK245 bereits bei 373 nm. Der nächste Vergrößerungsschritt zum Pyridocarbazol-Komplex ohne Maleimidfunktion (SEK257) führt zu einer weiteren Verschiebung auf 446 nm, und für den ursprünglichen Komplex SEK030 konnte ein Absorptionsmaximum von 512 nm gemessen werden. Dies zeigt, dass die Erweiterung des heterozyklischen Ringsystems vom Bipyridin zum Pyridocarbazol die maximale Anregungswellenlänge der Komplexe für eine photoinduzierte Reaktion deutlich in das sichtbare Spektrum verschiebt. Eine Widerspiegelung dieses Ergebnisses findet sich in den von KATHRIN WÄHLER durchgeführten wellenlängenabhängigen Messungen der Singulett Sauerstoff Produktion. Während der Bipyridin-Komplex lediglich bei einer Anregung mit $\lambda \geq 330$ nm die reaktive Spezies generiert, konnte diese bei den Verbindungen SEK245 und SEK257 auch nach einer Bestrahlung mit $\lambda \geq 415$ nm nachgewiesen werden. Ab einem Transmissionsbereich beginnend bei 505 nm, zeigt jedoch nur noch der ursprüngliche Komplex SEK030 eine messbare Produktion von $^1\text{O}_2$ (Abbildung 35b).^[155]

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss der vier Komplexe auf die Zellviabilität nach der Anregung mit den verschiedenen Wellenlängenbereichen untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine direkte Korrelation der Zytotoxizität der Verbindungen SEK245, SEK257 und SEK030 mit der gemessenen $^1\text{O}_2$ -Produktion (Abbildung 35c). Dies beweist, dass der Pyridocarbazol-Ligand nicht essentiell für die photodynamische Wirkung des Komplexes in der Zelle ist.

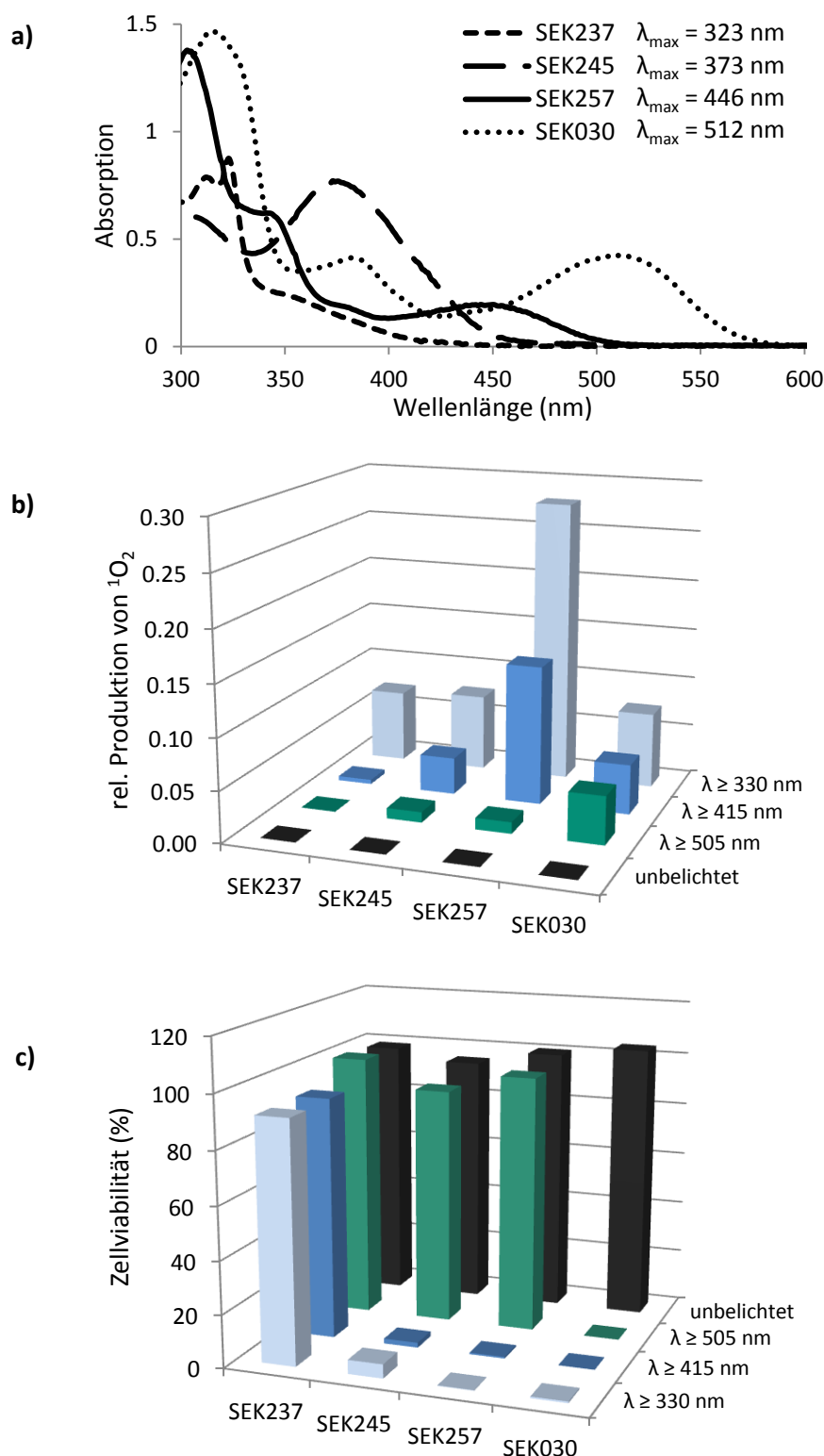


Abbildung 35: Untersuchung der photochemischen und photozytotoxischen Eigenschaften der Rhenium-Komplexe SEK237, SEK245, SEK257 und SEK030. **a)** Absorptionsspektren der Komplexe bei einer Konzentration von 60 μM in DMSO.^[155] **b)** Nachweis der $^1\text{O}_2$ -Produktion mit RNO (50 μM) und Imidazol (8 mM) in PBS/DMSO 1:1 nach einer 30-minütigen Belichtung mit einer Xe/Hg Bogenlampe (Komplekonz. 50 μM). Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert aus zwei unabhängigen Dreifachbestimmungen.^[155] **c)** Bestimmung der Viabilität von HeLa-Zellen mittels MTT-Test 24 h nach der Behandlung mit dem jeweiligen Komplexe (1 μM) und einer 15- (für $\lambda \geq 330 \text{ nm}$) bzw. 60-minütigen Belichtung mit einer Xe/Hg-Bogenlampe. Die Balken repräsentieren den Mittelwert von 18 Datenpunkten aus zwei unabhängigen Messungen.

Durch eine Reduzierung der Strukturelemente bis hin zum Pyridylindol kann der gleiche Effekt erzielt werden. Aus zellulärer Sicht scheint die Struktur des zweizähnigen Liganden daher nur einen untergeordneten Einfluss auf die Phototoxizität des Komplexes zu haben, solange dieser dazu in der Lage ist Singulett Sauerstoff zu generieren. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass für die photozytotoxische Wirkung der Komplexe keine spezifischen Wechselwirkungen zwischen dem Pyridocarbazol und einer bestimmten zellulären Zielstruktur notwendig sind. Dass die Struktur trotzdem einen Einfluss hat, beweist der Komplex SEK237. Dieser produziert zwar $^1\text{O}_2$, verringert jedoch nicht die Viabilität der Zellen. Weiterführende Lokalisationsexperimente mit einer Biotin-markierten Variante des Komplexes von JILLIAN JESPERSEN, KATHRIN WÄHLER und RAIMO HARTMAN, haben gezeigt, dass dieser Komplex selbst nach einer Inkubation von 24 h nicht in den Zellen nachgewiesen werden kann. Daraus kann geschlossen werden, dass die positive Ladung des Komplexes seine Aufnahme in die Zelle und damit auch seinen photozytotoxischen Effekt verhindert.

Zusammengefasst bedeutet dies für die Struktur-Aktivitäts-Beziehung des Komplexes SEK030, dass lediglich die Interaktion zwischen dem Rhenium und der Pyridylindol-Einheit innerhalb des Pyridocarbazols ausschlaggebend für die photodynamische Wirkung ist. Der zusätzliche Benzolring des Pyridocarbazols sowie die Maleimidgruppe verschieben lediglich die für den Effekt notwendige Anregungswellenlänge.

Optimierung der Stabilität

Im Zuge der Stabilitätsoptimierung wurde der Einfluss verschiedener Pyridinderivate als Liganden auf die Aktivität des Komplexes untersucht. Wie bereits erwähnt, neigt das Pyridin der Verbindung SEK030 speziell unter Lichteinfluss zu einem Austausch gegen einen geeigneten Liganden wie DMAP.^[144] Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass es auch im Zuge des Stoffwechsels im Körper oder in der Zelle zu vergleichbaren Austauschreaktionen kommt. Auf der Suche nach einem geeigneten Ersatz für diesen Liganden wurden verschiedene alternative Komplexe synthetisiert und auf die Beibehaltung ihrer photozytotoxischen Eigenschaften getestet. Zu ihnen gehören die Verbindungen ASSD06 mit dem Liganden 4-Trifluormethylpyridin und ASSD11 mit einem DMAP an der gleichen Position. Wie sich herausstellte, verringert der elektronenarme Ligand 4-Trifluormethylpyridin die Stabilität des Komplexes und erzielt damit nicht den gewünschten Effekt, auch wenn die photodynamische Wirkung auf HeLa-Zellen davon unbeeinflusst bleibt.^[144] Die gemessene Zellviabilität sinkt deutlich auf einen Wert von 13.3 % (± 5.7) nach einer 60-minütigen Belichtung mit $\lambda \geq 505$ nm bei einer Komplexkonzentration von 1 μM . Im Dunkeln zeigt die Verbindung weiterhin keine Toxizität bei einer Zellviabilität von 91.4 % (± 10.5) (Abbildung 36).

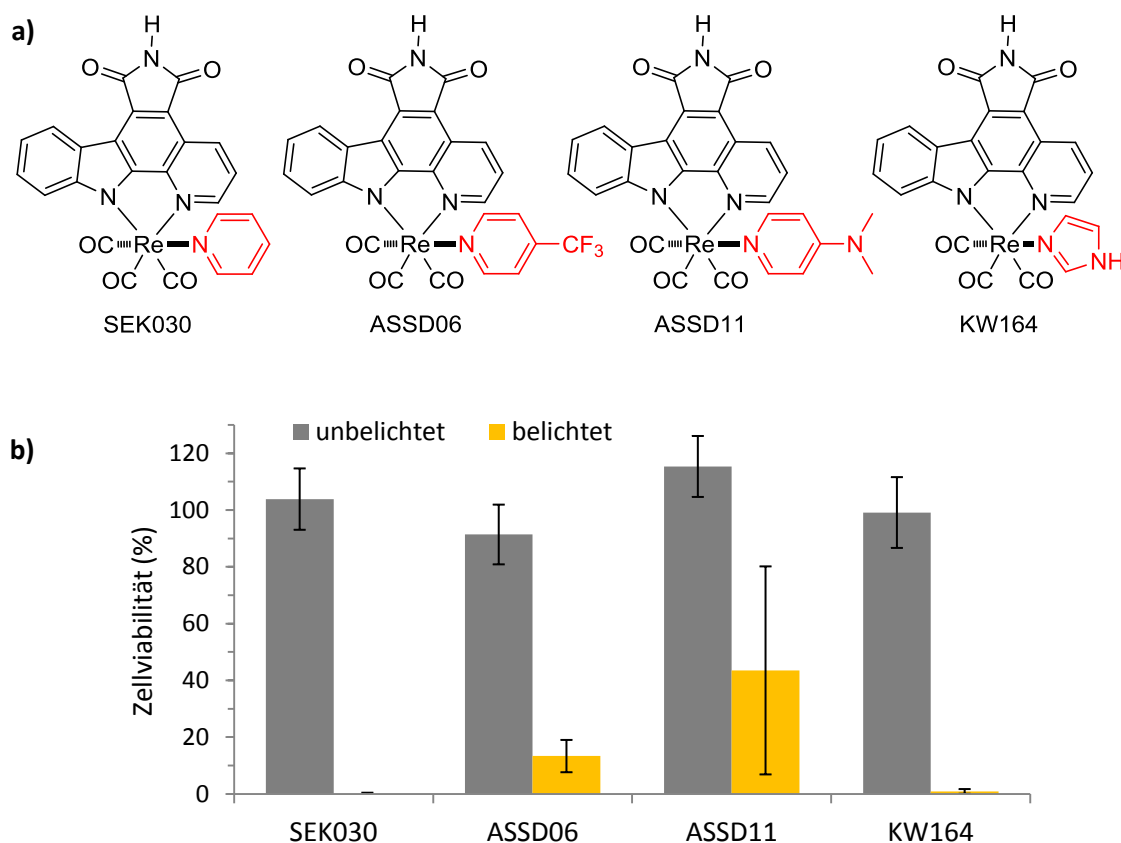


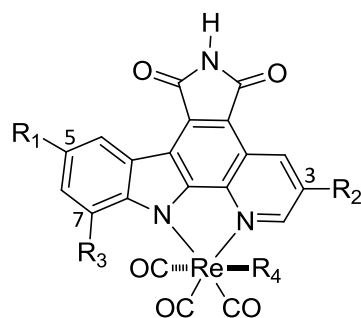
Abbildung 36: a) Abwandlungen des Komplexes SEK030 mit den Pyridinderivaten 4-Trifluormethylpyridin und 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) sowie einem Imidazol. **b)** Bestimmung der Zellviabilität von HeLa-Zellen nach der photodynamischen Behandlung mit den vier Komplexen. 1 h nach der Zugabe von $1 \mu\text{M}$ des entsprechenden Komplexes wurden die Zellen für 60 min mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 505 \text{ nm}$) belichtet. 24 h nach der Komplexzugabe wurde die Zellviabilität mittels MTT-Test bestimmt. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus 18 Datenpunkten, ermittelt in zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Für den Komplex mit dem elektronenreichen DMAP-Liganden konnte eine deutliche Zunahme der Stabilität im NMR-Experiment festgestellt werden^[144], allerdings führt dieser auch zu einer Abnahme des photozytotoxischen Effekts. Im Viabilitätstest konnte eine Überlebensrate von 115.4 % (± 10.7) ohne und 43.5 % (± 36.6) nach der Belichtung unter den gleichen Ausgangsbedingungen, wie im Versuch mit ASSD06, gemessen werden. In einem dritten Versuch wurde deshalb der Komplex KW164, mit dem ebenfalls elektronenreichen Liganden Imidazol, synthetisiert. Dieser Komplex zeigt eine 100 %ige Stabilität von mindesten 8 Tagen in einer DMSO/D₂O (9:1) Lösung unter Zusatz von 2-Mercaptoethanol im Dunkeln und von mindesten 4 h unter Belichtung in DMSO mit einem Zusatz von 1-Methylimidazol.^[139] Zusätzlich zu dieser sehr hohen Stabilität behält der Komplex seine photozytotoxischen Eigenschaften ohne Einschränkungen bei. Im Viabilitätstest wurde eine Überlebensrate von 99.1 % (± 12.5) im Dunkeln und 0.9 % (± 0.8) nach 60-minütiger Belichtung gemessen.

Mit der Verbindung KW164 konnte somit gezeigt werden, dass es möglich ist, eine hohe Komplexstabilität mit der photodynamischen Wirkung zu vereinen. Ausschlaggebend hierfür ist die Koordination eines monodentaten Liganden mit einer hohen Elektronendichte, die zur Ausbildung einer starken Sigma-Bindung mit dem Rhenium-Zentrum führt. Zusätzlich sollte der sterische Anspruch des Liganden möglichst gering sein, um eventuelle Auswirkungen auf die Zellaufnahme oder die Positionierung in der Zelle zu vermeiden. Erfüllt wird diese Bedingung durch die Bindung eines Imidazols, wie hier gezeigt oder auch durch die eines Phosphin-Liganden, wie ebenfalls im Zuge dieser Arbeit festgestellt werden konnte (siehe Anhang, Tabelle 14, Komplex KW297). Gleichzeitig bedeutet die zusätzliche gewonnene Stabilität, dass ein zytotoxischer Effekt der Verbindung, durch den Verlust eines Liganden und ein daraus resultierendes reaktives Metallzentrum, ausgeschlossen werden kann.

Optimierung der Anregungswellenlänge

Ein entscheidendes Kriterium für den *in vivo* Einsatz eines Photosensibilisators ist eine möglichst hohe Anregungswellenlänge zwischen 600 und 850 nm. Nur in diesem optischen Fenster dringt der für die Therapie eingesetzte Lichtstrahl tief genug in das Gewebe ein, um eine ausreichende Schädigung im Tumor zu verursachen.^[44] In einem letzten Optimierungsschritt wurde daher versucht, die benötigte Anregungsenergie der Komplexe durch verschiedene Modifikationen am Pyridocarbazol-Ligand zu senken und gleichzeitig den photodynamischen Effekt zu erhalten. Eine Auswahl, der größtenteils von KATHRIN WÄHLER synthetisierten Derivate und deren Einfluss auf λ_{max} sowie die photozytotoxische Wirkung, ist in Abbildung 37 dargestellt. Als eine der besten Methoden zur Verschiebung der Anregungswellenlänge hat sich die Einführung eines Substituenten mit einem starken +M-Effekt in der 5-Position des Indols herausgestellt. Die größte Verschiebung auf 562 nm konnte dabei mit dem Dimethylamin-Rest in Komplex KW315 erzielt werden. Leider unterdrückt dieser Rest gleichzeitig die Generierung von $^1\text{O}_2$ und damit auch die photozytotoxische Wirkung des Komplexes. Ebenfalls positiv auf die Anregungswellenlänge wirkt sich ein Fluor- oder Trifluormethylrest, in der 3-Position des Pyridins aus, wie die Komplexe KWPS16 und KWPS18 beweisen. Dies ist hauptsächlich auf den starken -I-Effekt des Fluors zurückzuführen. Die hier gemessenen Absorptionsmaxima von 528 und 537 nm fallen zwar nicht ganz so hoch aus, dafür beeinflussen die Substituenten in diesem Fall nicht die photodynamische Wirkung. Eine zusätzliche Verschiebung von λ_{max} kann erreicht werden, wenn neben dem Fluor am Pyridin eine Methoxygruppe auf der Indolseite eingefügt wird. Der daraus entstandene photozytotoxische Komplex KW224 hat ein Absorptionsmaximum bei 542 nm. Hingegen negativ auf die Erhöhung der Anregungswellenlänge wirkt sich eine zweifache Substituierung mit Fluor am Indol aus, wie am Beispiel des Komplexes SEK260 zu sehen ist.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	λ _{max}	photozytotoxisch
KW164	H	H	H	Imidazol	513 nm	ja
SEK260	F	H	F	Pyridin	493 nm	ja
KW224	OMe	F	H	Imidazol	542 nm	ja
KW263	OH	H	H	Imidazol	539 nm	nein
KW264	OMe	H	H	Imidazol	516 nm	ja
KW315	NMe ₂	H	H	Imidazol	562 nm	nein
KWPS16	H	F	H	Imidazol	528 nm	ja
KWPS18	H	CF ₃	H	Imidazol	537 nm	ja

Abbildung 37: Modifikationen des Rhenium-Pyridocarbazon-Komplexes und deren Auswirkungen auf das energetisch niedrigste Absorptionsmaximum sowie den photozytotoxischen Effekt in HeLa-Zellen. (Die Bestimmung der λ_{max}-Werte erfolgte durch KATHRIN WÄHLER und PATRICK SZABO die der Photozytotoxizität von KW263 und KW264 durch KATJA KRÄLING.)

Inwiefern die modifizierten Komplexe auch *in vitro* zu einem stärkeren Effekt bei höheren Anregungswellenlängen führen, hängt letztendlich jedoch nicht vom Absorptionsmaximum der Verbindungen ab, sondern von der Breite der Absorptionsbande. Des Weiteren spielt die Quantenausbeute eine entscheidende Rolle und damit die Fähigkeit der Komplexe auch bei einer sehr geringen Absorption noch Singulett Sauerstoff zu generieren. Deshalb ist es notwendig, sowohl die maximale Anregungswellenlänge für die Generierung von ¹O₂ zu finden, sowie auch festzustellen, ab welcher Grenze diese nicht mehr ausreichend für die Einleitung des apoptotischen Zelltods ist. Unter Berücksichtigung dieser Überlegungen und den gemessenen Absorptionsbanden in Abbildung 38a, wurden für den Versuch optische Filter mit einer unteren Transmissionsgrenze von 505, 560, 580 und 620 nm ausgewählt. Daneben wurden als repräsentative Verbindungen mit leicht unterschiedlichen Absorptionsbanden der Ausgangskomplex KW164 sowie SEK260 und die beiden Pyridin-substituierten Komplexe KWPS16 und KWPS18 ausgesucht. Wie die Abbildung 38b^[139] zeigt nimmt die ¹O₂-Produktion der Verbindungen ab einer Belichtung mit λ ≥ 560 nm schrittweise ab. Am stärksten ist dies für den Komplex SEK260

mit dem niedrigsten Absorptionsmaximum zu sehen. Die besten Werte bis zu einer Belichtung mit $\lambda \geq 580$ nm zeigt die Verbindung KWPS18. Ab einer Transmissionsgrenze von 620 nm ist für keinen der Komplexe eine $^1\text{O}_2$ -Produktion unter den gegebenen Bedingungen mehr nachweisbar. Damit spiegeln die Werte eindeutig die Erwartungen aus den gemessenen Absorptionskurven wider. Bei den durchgeführten *in vitro* Messungen mit einer Konzentration von 1 μM und einer 30-minütigen Belichtung unter Einsatz der verschiedenen optischen Filtern (Abbildung 38c) bestätigt sich dieser Trend hingegen nur teilweise. Auch hier schneidet die Verbindung SEK260 eindeutig am schlechtesten ab, da sie bereits ab einer Belichtung mit $\lambda \geq 560$ nm keine eindeutige Photozytotoxizität mehr zeigt (gemessene Zellviabilität $81.3 \% \pm 7.5$). Für die drei anderen Komplexe ist sowohl bei $\lambda \geq 560$ nm als auch bei $\lambda \geq 580$ nm noch ein deutlicher Einfluss auf die Zellviabilität zu sehen, der jedoch nicht mit der gemessenen $^1\text{O}_2$ -Produktion korreliert. Bei einer Belichtung mit Wellenlängen größer als 580 nm liegt die Überlebensrate für KW164 behandelte Zellen bei $29.8 \% (\pm 7.7)$, für KWPS16 bei $7.6 \% (\pm 2.1)$ und für KWPS18 bei $24.8 \% (\pm 5.7)$. Das bedeutet, dass trotz der höheren Singulett Sauerstoff Produktion des Komplexes KWPS18 bei dieser Wellenlänge der Komplex KWPS16 die bessere photozytotoxische Wirkung erzielt. Möglicherweise ist dies auf den größeren sterischen Anspruch des Trifluormethyl-Substituenten bei KWPS18 zurückzuführen. Dieser könnte zu einer schlechteren Aufnahme des Komplexes in die Zelle oder einer leicht veränderten Lokalisation innerhalb der Membran führen, die die Effizienz des durch den $^1\text{O}_2$ verursachten Schadens verringert. Kein photozytotoxischer Effekt konnte für die Komplexe oberhalb einer Transmissionsgrenze von 620 nm unter den gegebenen Bedingungen nachgewiesen werden. Um möglicherweise doch noch eine photodynamische Wirkung innerhalb des für therapeutische Zwecke so entscheidenden optischen Fensters zwischen 600 und 850 nm zu erzielen, wurden die Konzentration sowie die Belichtungszeit für die Viabilitätsmessung erhöht. Bei einer Konzentration von 5 μM und einer 60-minütigen Belichtung bei $\lambda \geq 620$ nm wurde dabei die Überlebensrate von HeLa-Zellen nach der Behandlung mit den Komplexen KW164, KWPS16, KWPS18 und KW224 untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 39 zeigen eine reduzierte Zellviabilität von $46.5 \% (\pm 4.9)$ für KW164, $10.5 \% (\pm 1.6)$ für KWPS16, $28.0 \% (\pm 3.3)$ für KWPS18 und von $20.4 \% (\pm 3.5)$ für den Komplex KW224. Diese Resultate bestätigen erneut, dass die Verbindung KWPS16 trotz ihres geringeren Absorptionsmaximums, die größte lichtinduzierte Zytotoxizität bei hohen Wellenlängen erzeugt. Das ist äußerst überraschend, besonders unter Berücksichtigung der Tatsache, dass eine Absorption dieses Komplexes bei 620 nm fast nichtmehr nachweisbar ist (Abbildung 38a).

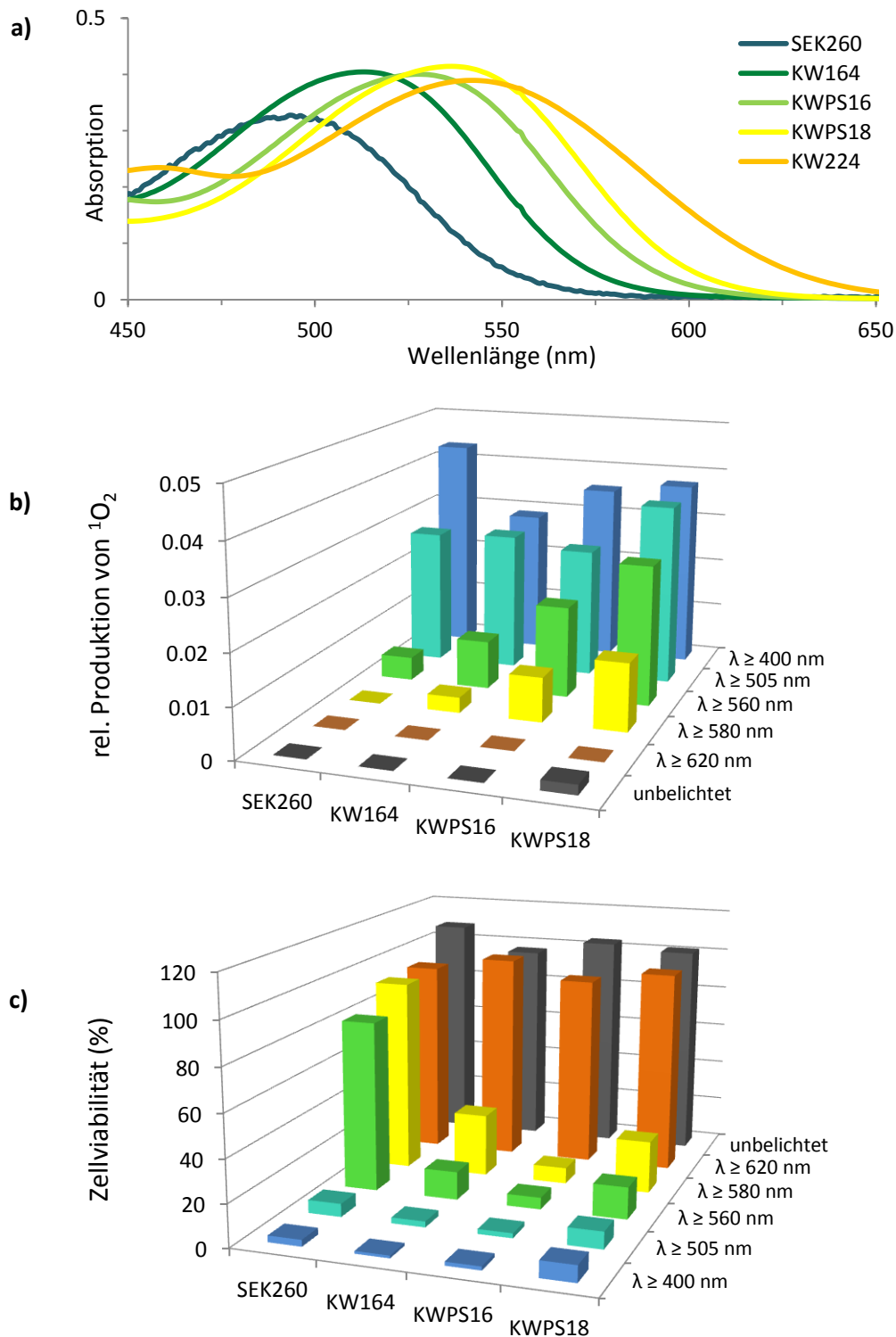


Abbildung 38: Untersuchung der photochemischen und photozytotoxischen Eigenschaften der Rhenium-Komplexe SEK260, KW164, KWPS16 und KWPS18 **a)** Absorptionsbande der Komplexe zwischen 450 und 650 nm.^[139] **b)** Nachweis der $^1\text{O}_2$ -Produktion mit RNO (50 μM) und Imidazol (8 mM) in PBS/DMSO 1:1 nach einer 30-minütigen Belichtung mit einem LED-Reflektor (Komplexkonzentration 50 μM).^[139] Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert aus zwei unabhängigen Dreifachbestimmungen. **c)** Bestimmung der Viabilität von HeLa-Zellen mittels MTT-Test 24 h nach der Behandlung mit dem jeweiligen Komplexen (1 μM) und einer 30-minütigen Belichtung mit einem LED-Reflektor. Die Balken repräsentieren den Mittelwert von 18 Datenpunkten aus zwei unabhängigen Messungen.

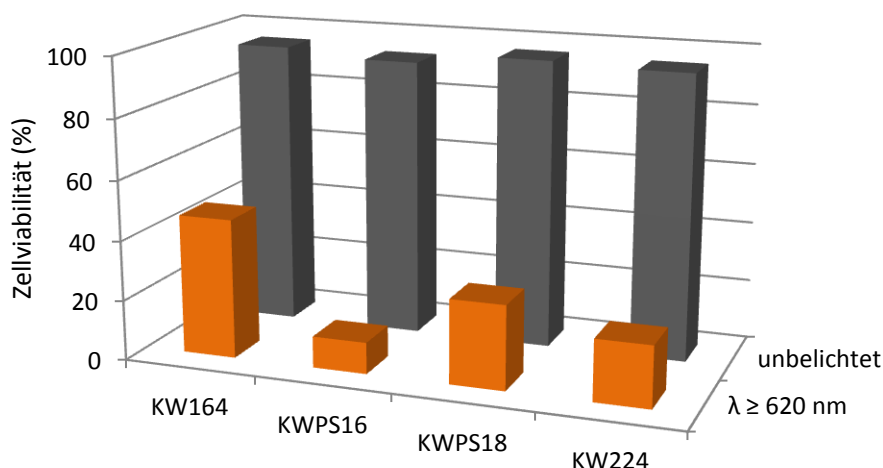


Abbildung 39: Bestimmung der Zellviabilität von HeLa-Zellen mittels MTT-Test 24 h nach einer Behandlung mit $5 \mu\text{M}$ der angegebenen Komplexe. 1 h nach der Komplexzugabe wurden ein Teil der Zellen für 60 min mit einem LED-Reflektor unter Verwendung eines Transmissionsfilters mit $\lambda \geq 620 \text{ nm}$ belichtet. Die dargestellten Balken repräsentieren den Mittelwert aus 18 einzelnen Datenpunkten die in zwei unabhängigen Versuchen ermittelt wurden.

Daraus wird ersichtlich, wie gering die tatsächliche Menge an $^1\text{O}_2$ sein muss, die für die Einleitung der Apoptose in den Zellen verantwortlich ist. Auch mit dem RNO-basierten $^1\text{O}_2$ -Nachweis lässt sich bei diesen hohen Wellenlängen erst nach einer Verdopplung der Belichtungszeit auf 60 min eine geringe Menge der reaktiven Spezies für die Verbindungen KWPS18, KWPS18 und KW224 detektieren (siehe Anhang). Für die Verbindung KW164 liegt die $^1\text{O}_2$ -Produktion bei diesen Bedingungen weiterhin unter der Nachweisgrenze.^[139]

Zusammengefasst konnte die Struktur des Komplexes SEK030 damit sowohl in Hinsicht auf ihre Stabilität, als auch ihre Anregungswellenlänge optimiert werden. Daraus hervorgegangen ist der Komplex KWPS16 mit einem 3-Fluor-substituierten Pyridin am Pyridocarbazol und einem Imidazol anstelle des monodentaten Pyridin-Liganden. Der gemessene EC_{50} -Wert dieses Komplexes liegt in HeLa-Zellen 24 h nach seiner Zugabe und einer anschließenden 30-minütigen Belichtung mit $\lambda \geq 580 \text{ nm}$ bei $0.3 \mu\text{M} (\pm 0.0)$ (Abbildung 40). Damit ist er nur minimal höher, als der des Ursprungskomplexes SEK030 nach einer 60-minütigen Belichtung bei $\lambda \geq 505 \text{ nm}$ ($0.1 \mu\text{M} \pm 0.0$). In Bezug auf die Dunkeltoxizität zeigen die beiden Komplexe jedoch klare Unterschiede. Hier besitzt der neue Komplex mit $10.0 \mu\text{M} (\pm 0.5)$ einen deutlich niedrigeren EC_{50} -Wert als SEK030. Dies ist vermutlich auf die bessere Löslichkeit des Komplexes im Zellkulturmedium zurückzuführen. Während für SEK030 ab einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ die Bildung eines Präzipitats unter dem Mikroskop zu beobachten ist, bleibt KWPS16 selbst bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ vollständig im Medium gelöst. Dies ist im Hinblick auf zukünftige *in vitro* oder auch *in vivo* Untersuchungen eine weitere wichtige Errungenschaft.

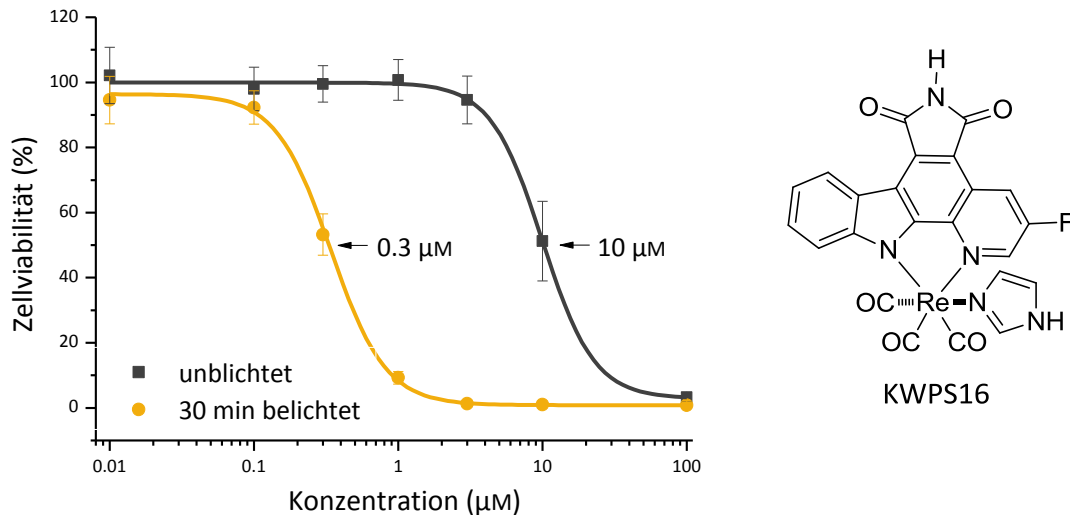


Abbildung 40: Konzentrationsabhängige Bestimmung der Zellviabilität für die photodynamische Behandlung von HeLa-Zellen mit dem Rhenium-Komplex KWPS16. 1 h nach der Zugabe des Komplexes wurden ein Teil der Zellen für 30 min mit einem LED-Reflektor ($\lambda \geq 580$ nm) belichtet. 24 h nach der Zugabe wurde die Viabilität mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus 18 einzelnen Datenpunkten, ermittelt in zwei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Unter der Berücksichtigung aller im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Messungen der Zellviabilität, geht daher eindeutig der Komplex KWPS16 als bester Photosensibilisator hervor. Ausschlaggebend hierfür ist besonders sein starker zytotoxischer Effekt nach der Belichtung mit Wellenlängen oberhalb von 600 nm, was ihn in diesem Punkt bereits vergleichbar mit bewährten Photosensibilisatoren wie Photofrin macht.

3.5 Kinase-inhibierende Eigenschaften der Photosensibilisatoren

Kinasen sind ein fester Bestandteil der zellulären Weiterleitung von Wachstumssignalen und als solche an einer Vielzahl von Krebserkrankungen beteiligt. Ihre Funktion besteht darin, andere Enzyme durch die Übertragung eines Phosphatrests des ATPs zu aktivieren oder deaktivieren. Diese als Phosphorylierung bekannte Reaktion ist einer der zentralen Regulationsmechanismen, mit denen eukaryotische Zellen die Aktivität ihrer Enzyme steuern und Wachstumssignale von der Plasmamembran in den Zellkern weiterleiten. Die Unterbrechung dieser Signalkaskade durch niedermolekulare Inhibitoren oder Antikörper hat sich zu einer erfolgreichen Strategie in der Krebstherapie entwickelt.

Wie zu Anfang bereits erwähnt, ist die Struktur des Pyridocarbazol-Liganden dem natürlichen Kinaseinhibitor Staurosporin nachempfunden und wurde für die kompetitive Hemmung dieser Enzymgruppe entwickelt. Ausschlaggebend hierfür ist, neben der zugeschnittenen Anpassung der Struktur durch die koordinierten Liganden, vor allem die Maleimidgruppe, die in einer analogen Weise zum Adenin Wasserstoffbrücken mit dem ATP-Erkennungsmotiv innerhalb der

Bindetasche ausbildet. Basierend auf dieser Grundlage, wurden auch die in dieser Arbeit vorgestellten Metallkomplexe ursprünglich für den Einsatz als Kinaseinhibitoren entwickelt.

VEGFR-Inhibition durch AW0234

Wie die Arbeiten von ALEXANDER WILBUER bereits gezeigt haben, besitzt der Komplex AW0234 eine hohe und sehr selektive Affinität zu den Rezeptoren des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGFRs). Insbesondere für VEGFR3 konnte eine halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 42 nM (± 2) bei gleichzeitiger Anwesenheit von 100 μ M ATP gemessen werden. Ebenfalls inhibiert werden VEGFR2 mit einem IC_{50} -Wert von 171 nM (± 5), VEGFR1 mit 230 nM (± 93) sowie Pim1 mit 333 nM (± 49).^[156] Insgesamt werden nur zwölf von 215 getesteten Kinasen bei einer Konzentration von 300 nM AW0234 und 10 μ M ATP um mehr als 50 % in ihrer Aktivität eingeschränkt, wie aus einem Selektivitätsprofil der Firma Millipore hervorgeht.^[114]

Als Rezeptoren des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors haben die VEGFRs eine wichtige Funktion bei der embryonalen Entwicklung des Gefäßsystems sowie der späteren Neubildung von Gefäßen im adulten Organismus. Daneben sind sie eine der Hauptakteure bei der pathogenen Gefäßneubildung im Zuge des Tumorwachstums.^[157] Dieser als Angiogenese bezeichnete Vorgang setzt bereits in einem sehr frühen Entwicklungsstadium der Krankheit ein und sichert dem malignen Gewebe die Versorgung mit O_2 und Nährstoffen. Ausgelöst wird der Prozess durch einen Sauerstoffmangel im Tumorkern und die dadurch verstärkte Ausschüttung von VEGF aus den Tumorzellen. Die anschließende Bindung des Wachstumsfaktors an die entsprechenden Rezeptoren des angrenzenden vaskulären Systems, leitet dann die Bildung neuer Gefäße in Richtung des Tumorgewebes ein. Alle drei bekannten Mitglieder der VEGFR-Familie gehören zur Gruppe der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Als solche bestehen sie aus einer extrazellulären, ligandenbindenden Domäne, einem lipophilen Transmembranabschnitt sowie einem ins Zytoplasma ragenden Kinasebereich. Infolge der Ligandenbindung dimerisiert der Rezeptor und es kommt zu einer internen Übertragung von Phosphatresten auf die in der Zelle gelegenen Tyrosinseitenketten des Enzyms. Diese Autophosphorylierung ist ausschlaggebend für die weitere Aktivierung wachstumsfördernder Signalwege, wie der MAPK-Kaskade oder der PI3K/AKT-vermittelten Transduktion.^[158] Wie die steigenden Zahlen zugelassener antiangiogener Wirkstoffe zeigen, stellt die Unterbrechung dieser Signalwege ein vielversprechendes Konzept der Krebstherapie dar.^[159] Erfolgreiche Beispiele sind die VEGFR-Inhibitoren Sorafenib und Sunitinib, die zur Behandlung von Nieren- bzw. gastrointestinalen Tumoren eingesetzt werden. Das Ziel der Therapie ist dabei, nicht eine toxische Wirkung in den Tumorzellen selbst zu erzeugen, sondern den Tumor von seiner Sauerstoff- und Nährstoffquelle abzuschneiden und ihn dadurch in seinem Wachstum einzuschränken. Dieser Ansatz unterscheidet sich deutlich von

der konventionellen Chemotherapie und bietet neue Optionen, besonders bei der Behandlung langsam wachsender Tumore, die auf die Gabe zytotoxischer Wirkstoffe nicht ansprechen.^[160] Neben der Angiogenese, die hauptsächlich durch die Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2 eingeleitet wird, existiert auch eine Tumor-vermittelte Neubildung lymphatischer Gefäße. Diese wird vorwiegend durch die Aktivierung von VEGFR3 ausgelöst.^[161] Neuere Studien sehen diesen Prozess als einen der Hauptwege zur Ausbreitung metastasierender Tumorzellen bei einigen Krebserkrankungen. Die Inhibierung von VEGFR3, wie sie für den Komplex AW0234 beobachtet wurde, verspricht daher nicht nur eine Unterbindung der Lymphangiogenese, sondern auch ein vermindertes Potential des Tumors zur Bildung von Metastasen.^[162,163]

Um die Eigenschaften von AW0234 in Bezug auf eine antiangiogene Wirkung genauer zu untersuchen, wurde der Komplex in einem Sphäroid-basierten 3D-Angiogenese Test eingesetzt (Abbildung 41). Ein solcher Versuch bietet die Möglichkeit komplexe Vorgänge, wie die Gefäßneubildung, in einem vereinfachten *in vitro* Modell nachzustellen und unter verschiedenen Testbedingungen zu analysieren. Für den Test wurden in eine Kollagenmatrix eingebettete HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) Sphäroide mit 5 µM AW0234 behandelt und gleichzeitig mit 25 ng/mL des Wachstumsfaktors VEGF stimuliert. Nach einer anschließenden 48-stündigen Inkubation wurden die Sphäroide unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Mikrovaskuläre Endothelzellen sind dafür bekannt, auch unter *in vitro* Bedingungen dreidimensionale Kapillar-ähnliche Strukturen zu bilden, die das natürliche *in vivo* Verhalten einer Gefäßzelle imitieren. Als entscheidende Größe zur Feststellung einer antiangiogenen Wirkung von AW0234, wurde daher die Gesamtlänge der gebildeten Auswüchse der einzelnen Sphäroide bestimmt. Diese beträgt für die Positivkontrolle ohne Zusatz des Inhibitors 1603 µm (± 595) und für die Negativkontrolle, die weder mit dem Inhibitor noch mit VEGF behandelt wurde, 215 µm (± 160). Sphäroide, die sowohl dem Inhibitor, als auch dem Wachstumsfaktor ausgesetzt waren erreichen eine kumulative Sprosslänge von 136 µm (± 151) und zeigen damit eine 100 %-ige Hemmung der angiogenen Wirkung von VEGF. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine methylierte Variante des Komplexes untersucht, die aufgrund der veränderten Maleimidstruktur keine Bindung mit der ATP-Bindetasche des Rezeptors eingehen kann. Dieser Komplex zeigt im Gegensatz zum unveränderten AW0234 eine Gesamtsprosslänge deutlich oberhalb der Negativkontrolle von 773 µm (± 357). Damit konnte demonstriert werden, dass der antiangiogene Effekt von AW0234 in einem Zusammenhang mit den Kinase-inhibierenden Eigenschaften der Verbindung steht. Der Komplex besitzt daher, neben dem bereits dargestellten photodynamischen Effekt, auch eine deutlich ausgeprägte antiangiogene Wirkung im *in vitro* Experiment.

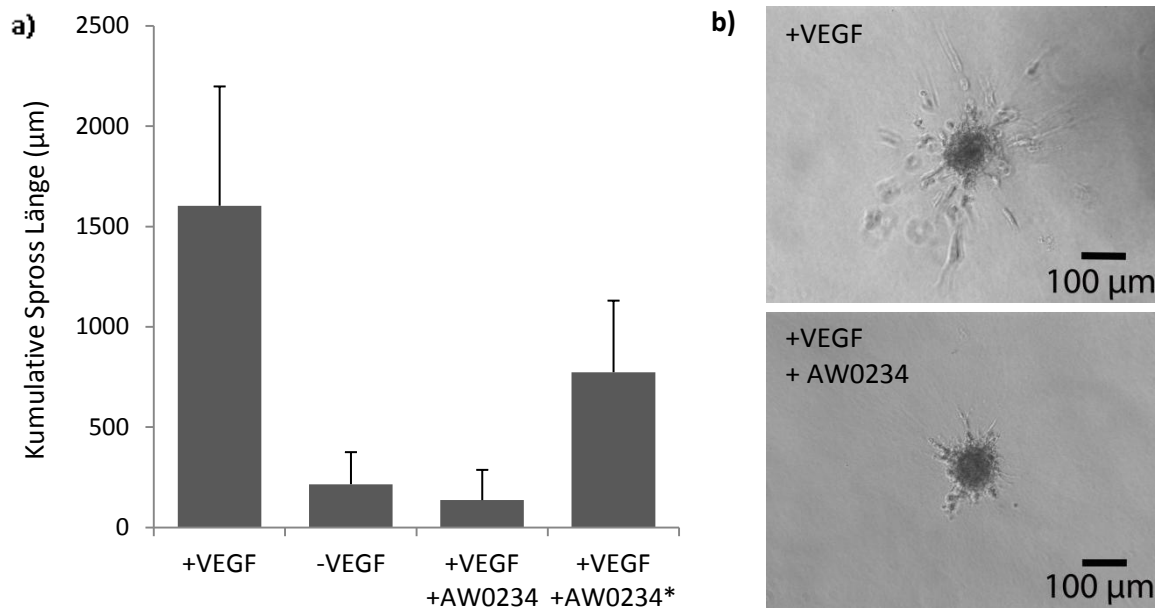


Abbildung 41: Nachweis einer antiangiogenen Wirkung von AW0234 im Sphäroid-basierten 3D-Angiogenese-Test. In einer Kollagenmatrix eingebettete HUVEC-Sphäroide wurden mit 5 µM AW0234 in a) bzw. 3 µM in b) bei gleichzeitiger Anwesenheit von 25 ng/mL VEGF für 48 h inkubiert. **a)** Gemessene kumulative Sprosslänge (KSL) der Sphäroide nach einer Stimulation mit VEGF, ohne VEGF sowie nach einer kombinierten Behandlung mit VEGF und dem Komplex AW0234 bzw. seiner am Maleimid methylierten Variante AW0234*. Die Positiv- sowie die Negativkontrolle ohne Zugabe des Komplexes basieren auf dem Mittelwert zehn individuell ausgewerteter Sphäroide. Die KSL der AW0234 behandelten Sphäroide basiert auf 24 und die der AW0234* behandelten auf 23 individuellen Werten. Die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung an. **b)** Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen zweier Sphäroide mit und ohne 3 µM AW0234 in Anwesenheit von VEGF.

Des Weiteren hat die Durchführung eines *transwell migration assays* von ANNA LENA MERKEL im Zuge ihrer Masterarbeit gezeigt, dass das Migrationsverhalten von HT29-Zellen durch die Behandlung mit 5 µM AW0234 komplett unterbunden werden kann.^[164] Die Fähigkeit ohne Zell-Zell-Kontakte oder die Interaktion mit der Extrazellulärenmatrix zu überleben und den ursprünglichen Gewebeverbund zu verlassen, ist ein charakteristisches Merkmal maligner Zellen. Die Untersuchung des Migrationsverhaltens gibt daher Aufschluss über das Metastasierungspotential und damit den Entartungsstatus der Zellen. Folglich ist die Unterbindung dieses Verhaltens einer der entscheidenden Ansatzpunkte der Krebstherapie. Die Ergebnisse zeigen, dass AW0234 das Potential besitzt, die Migration von HT29-Zellen deutlich einzuschränken. Dies ist vermutlich auf eine bekannte Kopplung der VEGFR-Signalwege mit der Reorganisation des Zytoskeletts zurückzuführen, die Voraussetzung für die Mobilität der Zellen ist.^[165]

Auf der Basis der bislang durchgeführten Versuche repräsentiert AW0234 damit eine bioaktive Verbindung mit einer dualen Wirkungsweise zur Bekämpfung von entarteten Zellen. Ob sich dieses Potential aus gekoppelter photodynamischer und antiangiogener Wirkung auch unter *in vivo* Bedingungen bestätigt, müssen zukünftige Versuche zeigen. Für die PDT wäre ein solcher

Photosensibilisator mit Sicherheit eine interessante Option. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, führt der durch die photodynamische Behandlung ausgelöste Sauerstoffmangel im Tumor häufig zu einer verstärkten Ausschüttung von VEGF und damit zur Angiogenese.^[109] Als Lösung dieses Problems wird daher bereits die zusätzliche Gabe eines antiangiogenen Wirkstoffs während der PDT untersucht.^[110] Des Weiteren kann die Bindung an einen im Tumorgewebe überexprimierten Rezeptor, wie VEGFR, dazu dienen, die Anreicherung des Wirkstoffs in den malignen Zellen zu fördern. Dieser Ansatz wird aktuell in dem relativ neuen Feld der Zielgerichteten Photodynamischen Therapie (*Targeted Photodynamic Therapy*) untersucht.^[166] Dabei spielt auch die Untersuchung von Antikörper- oder Liganden-gekoppelten Photosensibilisatoren, die an Rezeptoren wie EGFR oder VEGFR binden, eine Rolle. Die spezifische Aufnahme des Photosensibilisators in den Tumor soll dabei den gewünschten Effekt verstärken und Nebenwirkungen auf das umliegende Gewebe vermeiden sowie eine cutane Photosensitivität unterbinden. Eine interessante Fragestellung für zukünftige Versuche wäre daher, inwiefern der VEGFR-Inhibitor AW0234 ebenfalls dazu in der Lage ist, selektiv in das Tumorgewebe aufgenommen zu werden und dort seine photodynamische Wirkung zu entfalten, ohne dass er hierfür eines zusätzlichen Adressmoleküls bedarf.

Pim1-Inhibition durch SEK030

Auch der Rhenium-Komplex SEK030 wurde im Zuge dieser Arbeit auf seine Kinase-inhibitorischen Fähigkeiten untersucht. Für eine erste Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration wurde die Proteinkinase Pim1 ausgewählt. Diese ist aufgrund einiger vorangegangener Arbeiten für ihre Affinität zu den Pyridocarbazol-Metallkomplexen bekannt.^[114,127,167] Die in Abbildung 42 dargestellte Aktivität der Kinase, bei verschiedenen Konzentrationen von SEK030 und der gleichzeitigen Anwesenheit von 100 μM ATP, ergibt einen IC_{50} -Wert von 0.75 μM (± 0.13). Da für die Verbindung, wie bereits beschrieben, eine starke photodynamische Wirkung bekannt ist, wurde der Versuch auch unter dem zusätzlichen Einfluss einer Belichtung durchgeführt. Hierzu wurde das Reaktionsgemisch aus Kinase, Substrat und SEK030 vor der entscheidenden Zugabe des ATPs für 30 min mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 450 \text{ nm}$) belichtet. Der sich daraus ergebende IC_{50} -Wert liegt bei 0.55 μM (± 0.04) und ist damit nur minimal geringer als der der Dunkelbestimmung. Daraus kann geschlossen werden, dass die durch die Belichtung angeregte $^1\text{O}_2$ -Produktion des Komplexes keinen entscheidenden Einfluss auf die Inhibierung der Kinase hat. Generell fällt der inhibierende Effekt von SEK030 eher gering aus, verglichen mit anderen bekannten Pyridocarbazol-Metallkomplexen.

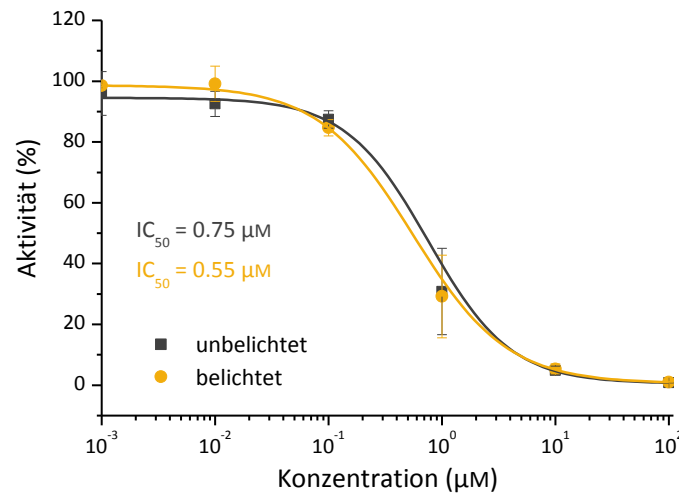


Abbildung 42: IC_{50} -Bestimmung des Rhenium-Komplexes SEK030 für die Proteinkinase Pim1 bei gleichzeitiger Anwesenheit von 100 μM ATP. Die Belichtete Probe wurde während der Inkubation des Komplexes mit der Kinase und ihrem Substrat mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 450$ nm) bestrahlt. Die hier dargestellten Ergebnisse basieren auf den Mittelwerten zwei unabhängig durchgeführter Doppelbestimmungen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Dies bestätigt auch ein durchgeführter KINOMEScan der Firma DiscoverX. Bei diesem Verfahren wird die Affinität des Inhibitors gegenüber mehr als 450 Kinasen getestet. Hierzu wird ein Ligand der Aktiventasche auf einem festen Substrat immobilisiert und zusammen mit einer bestimmten Kinase und der zu testenden Verbindung inkubiert. Der potentielle Inhibitor tritt dabei in Konkurrenz zum immobilisierten Liganden und verhindert dadurch die Bindung der Kinase an das Substrat. Nach Abschluss der Inkubation wird das Substrat gewaschen und es wird ermittelt, wie viel Prozent der Kinase dort im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Inhibitor gebunden haben. Die genaue Quantifizierung erfolgt dabei über einen an der Kinase angebrachten *DNA-Tag* und seine Amplifikation in einer qPCR. Für SEK030 wurde dieser Test mit einer Konzentration von 1 μM durchgeführt. In Tabelle 2 sind alle Kinasen aufgeführt, die dabei eine Bindung von ≤ 35 % der Kontrolle gezeigt haben. Wie zu sehen ist, erzielte Pim1 mit 16 % das dritt beste Ergebnis. Bessere Affinitäten konnten nur für GSK3A mit 15 % und PRKG2 mit 8 % festgestellt werden. Ein gewünschtes Ergebnis von unter 1 % konnte für keine der Kinasen erreicht werden. Das deutet darauf hin, dass Pim1 mit den bereits dargestellten IC_{50} -Werten zu einer der am stärksten durch SEK030 inhibierten Kinasen gehört.

Pim1 ist dafür bekannt im Zusammenhang mit diversen Krebserkrankungen zu stehen. Hierzu gehören verschiedene Leukämieerkrankungen und Lymphome sowie auch solide Tumore der Blase, Prostata, Pankreas und des Gastrointestinaltrakts.^[168] Ausschlaggebend hierfür ist die wachstumsfördernde und Apoptose-hemmende Wirkung der Kinase.

Tabelle 2: Auszug aus dem Ergebnis des KINOMEscans der Verbindung SEK030 bei einer Konzentration von 1 μM . Dargestellt sind alle Kinasen, bei denen die Bindung, an den im Versuch eingesetzten immobilisierten Liganden, auf mindestens 35 % der Kontrolle reduziert ist.

Kinase	% der Kontrolle
CLK2	26
DYRK1B	31
FLT3(D835Y)	32
GRK7	26
GSK3A	15
HIPK2	32
MELK	34
MST2	19
Pim1	16
PRKG2	8

Pim1 ist unter anderem an der Aktivierung zellzyklusregulierender Enzyme, wie Cdc25A und Cdc25C, beteiligt, welche den Übergang der G₁- in die S-Phase bzw. der G₂- in die M-Phase fördern.^[169,170] Außerdem inaktiviert es mit p21 einen Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), was zu einem weiteren positiven Wachstumssignal führt.^[171] Daneben ist eine Phosphorylierung des pro-apoptotischen Faktors Bad durch Pim1 bekannt.^[172] Diese verursacht den proteasomalen Abbau des Proteins und verschiebt dadurch das zelluläre Gleichgewicht zu Gunsten der anti-apoptotischen Faktoren. Dies sind nur einige der Regulationsmechanismen, mit denen Pim1 Einfluss auf das Zellwachstum nimmt. Trotz der bekannten erhöhten Aktivität der Kinase in einigen Krebserkrankungen, befindet sich die klinische Erforschung der Pim1-Inhibitoren jedoch erst in ihren Anfängen. Der erste in eine Phase I aufgenommene Wirkstoff SGI-1776 scheiterte an seiner zusätzlichen inhibierenden Wirkung auf die hERG Kaliumkanäle des Herzmuskels. Ein zweiter Inhibitor wird derzeit ebenfalls in Phase I untersucht.^[173] Das ist der Grund, warum bislang keine Daten über den tatsächlichen klinischen Erfolg der Pim1-Inhibition bei menschlichen Tumoren zur Verfügung stehen. Die Erwartungen sind jedoch hoch, dass Pim1 eines der neuen Angriffsziele der Krebstherapie werden könnte.

Mit den hier dargestellten IC₅₀-Werten erreicht der Komplex SEK030 nicht die Wirkung der zahlreichen anderen bekannten Pim1-Inhibitoren, deren Werte häufig im einstelligen nanomolaren bis picomolaren Bereich liegen.^[168,173] Trotzdem könnte die zusätzliche Kinase-inhibierende Funktion den Effekt der photodynamischen Therapie unterstützen. Besonders interessant ist dabei der Aspekt, dass Pim1 durch einen zellulären Sauerstoffmangel stabilisiert und dadurch vor seinem proteasomalen Abbau geschützt wird.^[174] Dies führt dazu, dass die Kinase in sehr vielen Tumorarten verstärkt aktiv ist.

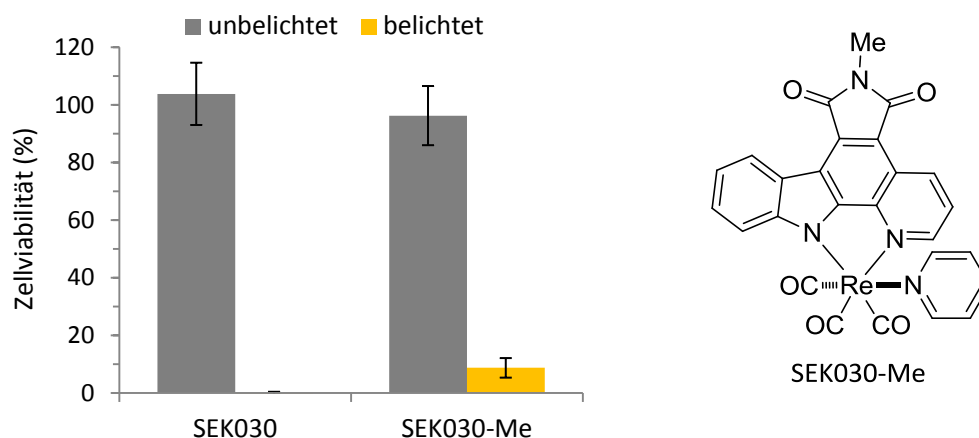


Abbildung 43: Bestimmung der Photozytotoxizität einer am Maleimid methylierten Variante von SEK030 ohne Kinase-inhibierende Eigenschaften im Vergleich zum unveränderten Komplex. Für den Versuch wurden HeLa-Zellen 1 h vor der Belichtung mit 1 μM des jeweiligen Komplexes behandelt. Die Belichtung erfolgte mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 505 \text{ nm}$) für ebenfalls 1 h. 24 h nach der Zugabe der Komplexe wurde die Zellviabilität mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus 18 individuellen Datenpunkten aus zwei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Da auch die PDT von einer hypoxischen Wirkung im Tumor begleitet wird, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass Pim1 auch in diesem Fall verstärkt aktiv ist und dem antiproliferativen Effekt der Therapie entgegen wirkt. Eine zusätzliche Inhibition von Pim1 könnte daher dazu beitragen, die von der Kinase ausgesendeten Überlebenssignale zu schwächen und den allgemeinen photozytotoxischen Effekt zu verstärken.

Wie auch für AW0234, wurde die Unabhängigkeit des photozytotoxischen Effekts von den Kinase-inhibierenden Eigenschaften mit Hilfe einer veränderten Maleimidstruktur am Pyridocarbazol überprüft. Trotz der dadurch verhinderten Bindung in der Aktiventasche der Kinasen, bleibt die Photozytotoxizität des Komplexes in vollem Umfang erhalten (Abbildung 43). Bei einer Konzentration von 1 μM und einer Belichtung mit $\lambda \geq 505 \text{ nm}$ für 60 min konnte eine verbleibende Zellviabilität von 8.7 % (± 3.4) für den methylierten Komplex gemessen werden. Im Dunkeln liegt diese bei 96.3 % (± 10.3). Der unveränderte Komplex führt unter diesen Bedingungen zu einer Zellviabilität von 0.0 % (± 0.5) nach Belichtung und 103.9 % (± 10.8) im Dunkeln.

Tabelle 3: IC_{50} -Werte der Komplexe SEK030, KW164 und KWPS16 für Pim1, bei einer ATP-Konzentration von 10 μM .

Komplex	IC_{50} -Wert
SEK030	84 nM
KW164	58 nM
KWPS16	75 nM

In einer abschließenden Messung wurden von KATHRIN WÄHLER die Pim1-Inhibition durch die optimierten Komplexe KW164 und KWPS16 untersucht.^[139] Die in Tabelle 3 dargestellten IC_{50} -Werte zeigen, dass weder das Imidazol anstelle des Pyridins, noch das zusätzliche Fluor am Pyridocarbazol, die Affinität des Komplexes zur Kinase maßgeblich beeinflusst. Die Tatsache, dass die Werte trotzdem um etwa einen Faktor 10 geringer ausfallen liegt daran, dass in diesem Fall auch nur ein Zehntel der ATP-Konzentration eingesetzt wurde. Ob die Kinase-inhibierende Eigenschaft der Komplexe zukünftig weiter verbessert werden kann, bleibt fraglich. Hauptverantwortlich für die eingeschränkte Affinität ist vermutlich der große sterische Anspruch des Pyridin- oder auch Imidazol-Liganden. Diese durch eine kleinere Struktur zu ersetzen ist eine äußerst schwierige Aufgabe.

Zusammengefasst haben die Ergebnisse dieses Abschnitts gezeigt, dass es möglich ist organometallische Komplexe herzustellen, die gleichzeitig als Photosensibilisator und Kinaseinhibitor wirken. Ausschlaggebend für beide Effekte ist die Verbindung eines Pyridocarbazol-Liganden mit einem koordinierten Iridium- oder Rhenium-Zentrum. Dies unterscheidet den hier gewählten Ansatz von anderen kombinierten Wirkstoffen, wie den Konjugaten aus Hämatoporphyrinen oder Phthalocyaninen mit Cisplatin, bei denen zwei bereits bekannte Strukturen mit antiproliferativer Wirkung miteinander verbunden werden.^[175,176]

4 Zusammenfassung und Ausblick

Metalle werden aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften bereits seit langem zur Heilung von Krankheiten eingesetzt. Im antiken Griechenland nutzte HIPPOKRATES die Wirkung Arsen-haltiger Minerale zur Behandlung von Geschwüren und auch Goldpräparate fanden im Laufe der Jahrhunderte immer wieder Anwendung in der Medizin.^[177,178] Heutzutage profitiert vor allem die Krebstherapie von Metall-haltigen Medikamenten wie Cisplatin oder auch radioaktiven Wirkstoffen aus Rhenium und Technetium.

Mit dieser Arbeit und den Ergebnissen meiner Masterarbeit konnte zum ersten Mal eine photozytotoxische Wirkung Iridium- und Rhenium-basierter Metallkomplexe gegen eine Reihe etablierter Krebszelllinien festgestellt werden.^[143,155] Die untersuchten Verbindungen AW0234 und SEK030 zeigen bereits nach einer einstündigen Belichtung mit sichtbarem Licht einen deutlichen antiproliferativen Effekt auf kultivierte HeLa- und HT29-Zellen. Die hierbei gemessenen EC₅₀-Werte liegen zwischen 0.1 und 0.3 μM und sind damit, je nach Verbindung und Zelllinie, 35 bis 1000-fach niedriger als die entsprechenden Werte der Dunkeltoxizität (Abbildung 44). Auf der Suche nach dem Auslöser dieses ausgeprägten photozytotoxischen Effekts, konnte eine lichtabhängige Generierung von Singulett Sauerstoff durch die Komplexe, mit dem redoxsensitiven Farbstoff RNO, nachgewiesen werden.^[139] $^1\text{O}_2$ ist eine extrem reaktive Spezies und dafür bekannt, mit sämtlichen zellulären Bestandteilen seiner Umgebung zu reagieren. Um festzustellen, ob er auch die Ursache des beobachteten photozytotoxischen Effekts ist, wurden die Zellen vor der Belichtung mit dem lipophilen Antioxidans α -Tocopherol behandelt. Wie sich herausstellte, unterdrückt die Anwesenheit des Tocopherols tatsächlich einen großen Teil der toxischen Wirkung auf die Zellen und liefert damit den indirekten Beweis, dass der beobachtete Effekt auf die Produktion von $^1\text{O}_2$ zurückzuführen ist.

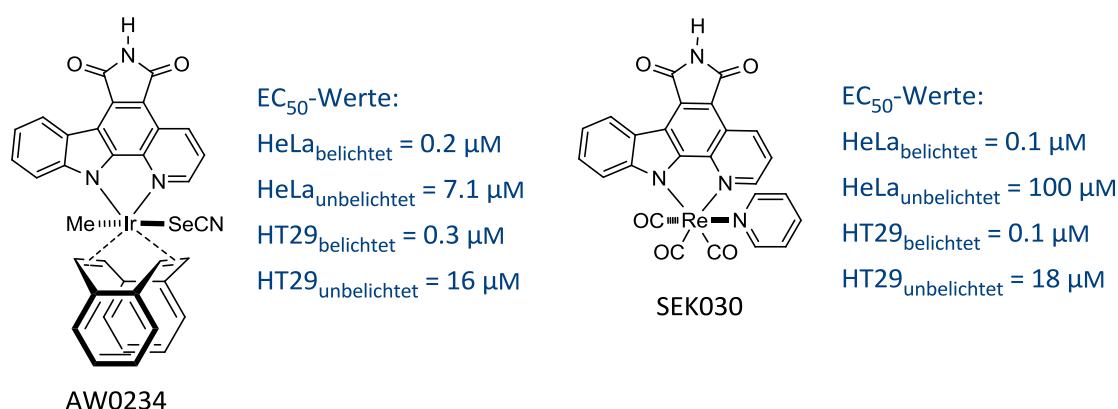


Abbildung 44: Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten organometallischen Komplexe mit den entsprechenden EC₅₀-Werten in HeLa- und HT29-Zellen unter belichteten und unbelichteten Bedingungen. (AW0234: Belichtung für 60 min mit $\lambda \geq 450$ nm; SEK030: Belichtung für 60 min mit $\lambda \geq 505$ nm)

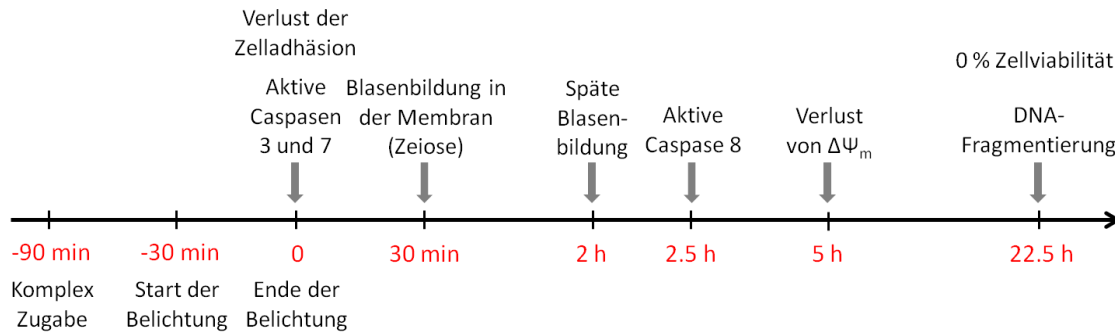


Abbildung 45: Zeitliche Abfolge der zellulären Ereignisse nach einer photodynamischen Behandlung mit 1 μM SEK030 und sichtbarem Licht.

Das Prinzip einer lichtaktivierten Generierung von $^1\text{O}_2$ zur selektiven Zerstörung von Zellen ist in der Medizin seit längerem bekannt und wird in Form der Photodynamischen Therapie zur Behandlung von Krebs angewendet. Die hierbei eingesetzten Photosensibilisatoren entfalten ihre Wirkung durch eine direkte Aktivierung des apoptotischen Signalwegs, die stark abhängig ist von der zellulären Lokalisation des Wirkstoffs.^[81]

Als Verbindung mit dem am stärksten ausgeprägten photozytotoxischen Effekt wurde der Rhenium-Komplex SEK030 ausgewählt, um die zelluläre Wirkungsweise der lichtaktivierten Metallkomplexe zu untersuchen. Dabei konnten zahlreiche Veränderungen an der Oberfläche sowie auch im Inneren der Zellen festgestellt werden. Die in Abbildung 45 dargestellte Zeitachse verdeutlicht die chronologische Abfolge der beobachteten Ereignisse. Direkt mit dem Beginn der Belichtung setzt auch ein Verlust der Zelladhäsion bei den mit SEK030 behandelten Krebszellen ein, welcher nach etwa 30 min abgeschlossen ist. Dies geht aus den Ergebnissen einer Echtzeit-Zellviabilitäts-Analyse hervor. Daneben konnte gezeigt werden, dass bereits zur gleichen Zeit die Effektor-Caspasen 3 und 7 aktiv sind. Mikroskopische Studien ergänzen dieses Bild und zeigen ein deutliches Schrumpfen der Zellen 30 min nach dem Ende der Belichtung sowie die Bildung kleiner Blasen in der Plasmamembran. Diese erste Phase der Blasenbildung geht etwa 2 h nach der Belichtung in eine zweite Phase über, bei der deutlich größere, dafür aber weniger Blasen an der Membranoberfläche zu sehen sind. Diese morphologischen Veränderungen der Zellen sind vermutlich auf eine Umorganisation des Zytoskeletts zurückzuführen, wie sie typisch für apoptotische Zellen ist. Eine Aktivierung der Initiator-Caspase 8 lässt sich erst 2.5 h nach der Belichtung nachweisen, was bedeutet, dass diese nicht an der Aktivierung der bereits deutlich früher aktiven Effektor-Caspasen 3 und 7 beteiligt ist. Das Gleiche gilt für den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, welcher erst 5 h nach der Belichtung gemessen werden konnte. Weitere Untersuchungen ergaben, dass 23 h nach der Belichtung ein Großteil der nukleären DNA fragmentiert vorliegt und die Viabilität der Zellen zu diesem Zeitpunkt auf annähernd 0 % abgesunken ist.

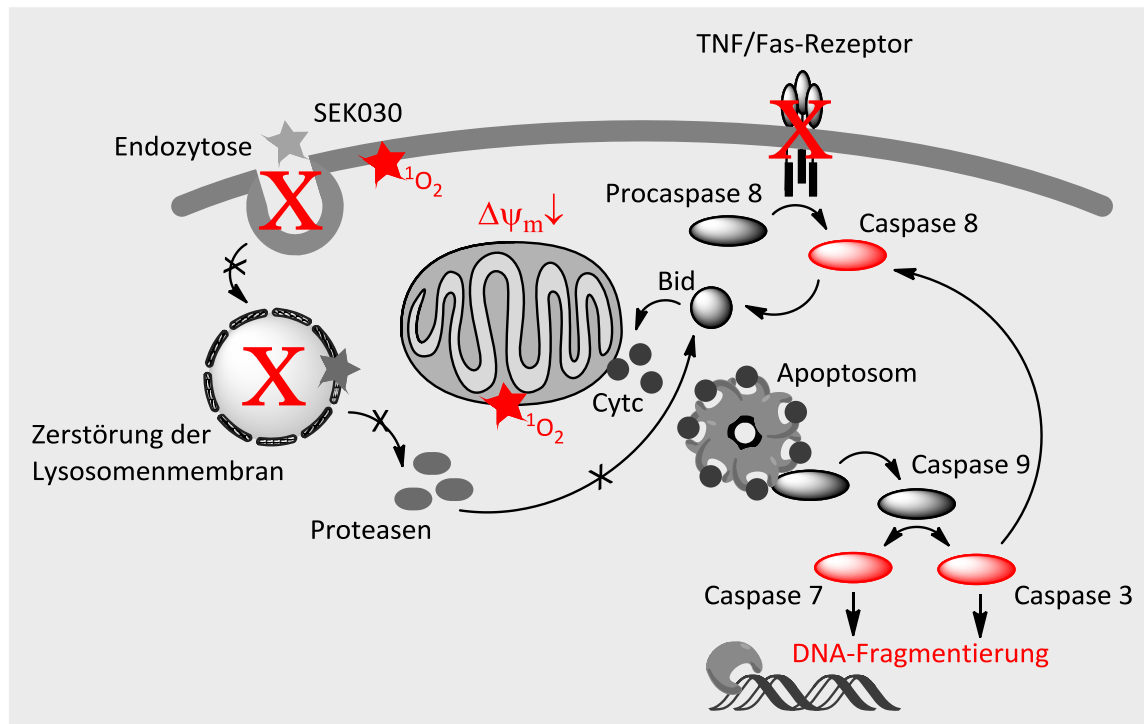


Abbildung 46: Einordnung der nachgewiesenen bzw. ausgeschlossenen zellulären Ereignisse nach der photodynamischen Behandlung mit SEK030 (rot) in den Apoptosesignalweg.

All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es bereits wenige Minuten nach der lichtaktivierten Behandlung zu einer Einleitung der Apoptose in den kultivierten Krebszellen kommt. Abbildung 46 versucht die gemachten Beobachtungen, zu den zellulären Ereignissen nach der photodynamischen Behandlung mit SEK030, in den bekannten Ablauf der Apoptose einzuordnen. Wie festgestellt werden konnte, lagert sich der Komplex zu einem gewissen Teil in den Mitochondrien und der Plasmamembran an, ist aber nicht in den Endosomen und Lysosomen oder dem Zellkern vorhanden. Dies geht aus den Lokalisationsversuchen mit einem Biotin-markierten SEK030 hervor. Daraus kann zunächst geschlossen werden, dass der Komplex nicht über einen endosomal, aktiven Transport in die Zelle gelangt, sondern, aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft, die Membran vermutlich auf passivem Weg durchquert. Es schließt ebenfalls aus, dass es infolge der photodynamischen Behandlung zu einer Zerstörung der Lysosomen kommt, wie es für die Photosensibilisatoren Npe6 und LuTex bekannt ist.^[92] Unabhängig davon deutet jedoch vieles darauf hin, dass der belichtete Komplex den Mitochondrien-vermittelten Apoptosesignalweg aktiviert. Dies kann vor allem aus den aktiven Caspasen 3 und 7 sowie der nachgeschalteten Aktivierung der Caspase 8 geschlossen werden. Die Tatsache, dass die Effektor-Caspasen 3 und 7 vor der Initiator-Caspase 8 aktiv sind, schließt eine Einleitung der Apoptose über den extrinsischen Signalweg aus. Dieser beinhaltet normalerweise die Aktivierung Membran-lokalisierter Rezeptoren, wie des TNF/Fas-Rezeptors,

durch extrazelluläre Liganden und die anschließende Spaltung der Procaspase 8 auf der intrazellulären Seite. Eine aktive Caspase 8 kann einerseits zu einer direkten Aktivierung der Effektor-Caspasen 3 und 7 führen oder andererseits den Mitochondrien-vermittelten Signalweg über den pro-apoptotischen Faktor Bid einleiten.^[179] Im Falle einer intrinsischen Apoptose kann die Caspase 8 jedoch auch nachgeschaltet durch die Caspasen 3 und 7 aktiviert werden und dient dann lediglich einer Verstärkung des bereits aktiven Signalwegs.^[148] Da die Caspase 8 als Aktivator der Caspasen 3 und 7 ausscheidet, muss von einer Aktivierung durch die Caspase 9 ausgegangen werden. Diese ist ein Mitglied des Mitochondrien-vermittelten Apoptosewegs und wird ihrerseits durch einen Proteinkomplex mit der Bezeichnung Apoptosom aktiviert. Dieser aus dem zytosolischen Protein APAF-1 und dem aus den Mitochondrien ausgeschütteten Cytochrom c bestehende Komplex spaltete die Procaspase 9 und setzt damit die Aktivierung aller weiteren Effektor-Caspasen in Gang.^[179] Diese aktivieren in weiteren Schritten unter anderem die Caspase-aktivierte DNase (CAD), welche für die Fragmentierung der DNA verantwortlich ist. Wie und ob es nach der photodynamischen Behandlung mit SEK030 zu einer Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien kommt, konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Die nachgewiesene Lokalisation des Komplexes in den Mitochondrien deutet jedoch darauf hin, dass oxidative Schäden in der Membran dieses Organells zu solch einer Freisetzung führen könnten. Ausgeschlossen werden kann hingegen ein Zusammenhang zwischen dem Verlust von $\Delta\Psi_m$ und der Freisetzung von Cytochrom c aufgrund der Tatsache, dass der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials erst nach der Aktivierung der Caspasen erfolgt.

Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen ähneln in vielen Punkten denen, die auch bei der Untersuchung der Wirkungsweise bereits etablierte Photosensibilisatoren aus der PDT gemacht wurden. Dies gilt insbesondere für die Lokalisation in der Mitochondrienmembran^[81], die schnelle Einleitung der Apoptose und die mit ihr verbundenen morphologischen Veränderungen der Zelle^[134]. Deutlich unterschiedlich ist hingegen die Struktur der Komplexe, verglichen mit den bereits bekannten Photosensibilisatoren. Mit einigen wenigen Ausnahmen basieren alle Photosensibilisatoren der PDT, die sich derzeit in klinischen oder prä-klinischen Studien befinden, auf Porphyrin-ähnlichen Ringsystemen, wie Chlorinen, Bacteriochlorinen, Porphycenen, Phthalocyaninen oder Taxaphyrinen. Allerdings werden auch hier in den letzten Jahren verstärkt Metall-zentrierte Varianten erforscht, um die Quantenausbeute der Verbindungen zu steigern.^[51] Die in dieser Arbeit untersuchten Komplexe AW0234 und SEK030 sind daher nicht nur die ersten photozytotoxischen Beispiele organometallischer Iridium- und Rhenium-Komplexe, sondern bilden auch strukturell gesehen eine völlig neue Klasse biologisch aktiver Photosensibilisatoren. Zudem unterscheiden sie sich in ihrer Wirkungsweise deutlich von

anderen lichtaktiven $^1\text{O}_2$ -Produzenten, wie den Ruthenium(II)-Polypyridyl-Komplexen, die zur Spaltung nukleärer DNA genutzt werden.^[180] Eine solche Wirkung kann zumindest für den Komplex SEK030 aufgrund der fehlenden Lokalisation im Zellkern ausgeschlossen werden. Auch für keinen der klinisch zugelassenen Photosensibilisatoren ist eine solche Interaktion mit der DNA bekannt und sie ist darüber hinaus in der PDT unerwünscht, da sie zu weiteren Mutationen der entarteten Zellen und damit zu Resistenzen führen kann.^[52,108] Daneben würde in einem solchen Fall die Apoptose über einen p53-vermittelten Signalweg eingeleitet werden, der in vielen Krebsarten inaktiviert ist.

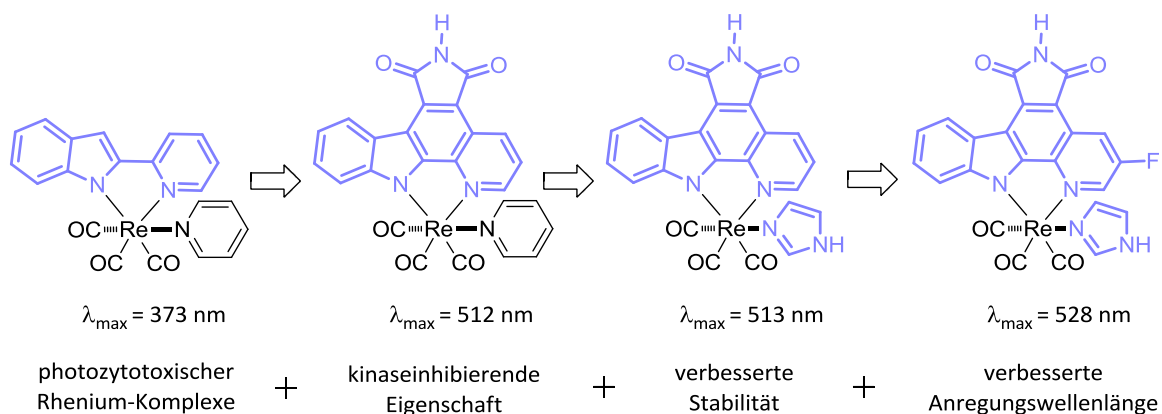
Mit ihrer schnellen Apoptose-induzierenden Wirkung, ihrer guten Aufnahme in die Zelle, ihrer geringen Dunkeltoxizität und den niedrigen EC_{50} -Werten, erfüllen die Komplexe AW0234 und SEK030 bereits einige wichtige Faktoren, um auch *in vivo* eine photodynamische Wirkung gegen Krebszellen zu erzeugen. Um auch die notwendige Anregungswellenlänge oberhalb von 600 nm und eine ausreichende Stabilität für diese Anwendung zu erreichen, wurde die Struktur des Komplexes SEK030 weiter optimiert.

Da bereits aus NMR-Analysen ein Austausch des Pyridin-Liganden gegen DMAP bekannt war^[144], wurde nach einem geeigneten Ersatz dieses Liganden gesucht, um mögliche unerwünschte Reaktionen mit dieser Koordinationsstelle in der Zelle zu vermeiden. Wie sich herausstellte, führt gerade die Bindung eines solchen elektronenreichen Liganden wie DMAP zu einer deutlich stärkeren Sigmapbindung mit dem Rhenium-Zentrum und damit zu einer höheren Stabilität, als z.B. ein elektronenarmer Ligand wie 4-Trifluormethylpyridin. Allerdings verschlechtert der etwas größere DMAP-Ligand auch die photozytotoxische Eigenschaft des Komplexes. Als eine deutlich stabilere Variante des Komplexes SEK030, die trotzdem ihre photozytotoxische Wirkung behält, konnte der Komplex KW164 ermittelt werden. Dieser koordiniert ein ebenfalls elektronenreiches Imidazol anstelle des Pyridins und ist in DMSO unter Lichteinfluss für mindestens 4 h stabil.^[139]

In Bezug auf die Optimierung der Anregungswellenlänge zeigte der Austausch des Pyridin-Liganden keinen Einfluss. Im nächsten Schritt wurde daher die Struktur des Pyridocarbazols modifiziert.^[144] Dabei konnte festgestellt werden, dass es möglich ist, den zweizähligen Liganden bis hin zu einem Pyridylindol zu verkleinern, ohne die photozytotoxische Eigenschaft des Komplexes zu verlieren. Die Kombination aus Pyridylindol und koordiniertem Übergangsmetall stellt damit die Grundeinheit der photozytotoxischen Komplexe dar. Allerdings bedeutet diese strukturelle Veränderung auch eine deutliche Verschiebung des Absorptionsspektrums in Richtung der niedrigeren Wellenlängen. Anstatt der zuvor möglichen Anregung mit einem Lichtspektrum von $\lambda \geq 505$ nm, benötigt der Pyridylindol-Komplex für seine Aktivierung auch den kompletten Blauanteil des Lichts ($\lambda \geq 415$ nm). Für eine Erhöhung der Anregungswellenlänge

wurde daher die Grundstruktur des Pyridocarbazols beibehalten und diese lediglich um verschiedene Substituenten ergänzt.^[139] Die größte mögliche Verschiebung konnte dabei mit einem Dimethylamin-Rest in der 5-Position des Indols erzielt werden. Allerdings zeigte der Komplex mit einem λ_{max} von 562 nm keine photodynamische Wirkung. Einen ebenfalls positiven Effekt auf die Verschiebung des Absorptionsspektrums hat die Einführung eines Substituenten mit einem starken -I-Effekt in der 3-Position des Pyridins. Von den beiden untersuchten Komplexen mit einem Fluor- ($\lambda_{\text{max}} = 528$ nm) und einem Trifluormethyl-Rest ($\lambda_{\text{max}} = 537$ nm) in dieser Position, zeigte die Fluor-substituierte Variante die deutlich bessere photozytotoxische Wirkung nach einer Anregung mit $\lambda \geq 620$ nm. Auch die zusätzliche Einführung einer Methoxygruppe auf der Indolseite, die das Absorptionsmaximum des Komplexes um weitere 14 nm erhöht, führte unter diesen Bedingungen zu keiner Steigerung des zellulären Effekts. Damit geht der Komplex KWPS16, mit einem Imidazol anstelle des Pyridin-Liganden und einem Fluor-substituierten Pyridocarbazol, als bester Photosensibilisator dieser Arbeit hervor (Schema 3). Im Vergleich zu seinen Vorgängern beweist er eine deutlich höhere Stabilität unter Lichteinfluss und er zeigt als einziger Komplex eine verbleibende Zellviabilität von unter 20 % bei einer Konzentration von 5 μM und der Anregung mit Wellenlängen oberhalb von 620 nm.

Mit diesen Verbesserungen konnten zwei weitere entscheidende Voraussetzungen für einen möglichen *in vivo* Einsatz der Komplexe erfüllt werden. Mit einer Anregungswellenlänge von 620 nm liegt die Absorption des Komplexes KWPS16 eindeutig im optischen Fenster der PDT zwischen 600 und 850 nm. Die Einhaltung dieser Grenzen ist entscheidend bei der Bestrahlung eines Tumors, da alle anderen Wellenlängen fast komplett von den Bestandteilen des umliegenden Gewebes absorbiert werden.^[44] Zusätzlich senkt die gesteigerte Stabilität des Komplexes die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Nebenwirkungen durch dissoziierende Liganden oder ein entstehendes reaktives Metallzentrum.



Schema 3: Struktureller Aufbau und Optimierung eines photozytotoxischen Rhenium-Komplexes.

Eine erste Vorbereitung für einen möglichen *in vivo* Einsatz der Komplexe wurde bereits mit der Durchführung dreidimensionaler Zellkulturexperimente getroffen. Die hierbei festgestellte zytotoxische Wirkung von SEK030 auf belichtete Melanom-Sphäroide, liefert einen Hinweis darauf, dass die Verbindungen ihre Funktionalität auch in komplexen Zellstrukturen beibehalten. Neben der photozytotoxischen Eigenschaft der Komplexe wurde ihre Funktion als Kinaseinhibitoren weiter untersucht. Für den bereits bekannten Inhibitor der VEGFR Rezeptor-Tyrosinkinase AW0234 konnte dabei eine antiangiogene Wirkung auf mikrovaskuläre, endotheliale Zellsphäroide festgestellt werden. Diese duale Funktionalität aus photozytotoxischem und antiangiogenem Effekt stellt besonders für die PDT eine interessante Wirkungskombination dar. Einige der bereits zugelassenen Photosensibilisatoren sind dafür bekannt eine antiangiogene Wirkung auf die Gefäße von Tumoren auszuüben, indem sie diese zerstören oder die Bildung von Thromben verursachen. Gleichzeitig führt der dadurch hervorgerufene Sauerstoffmangel im Gewebe aber häufig zu einer verstärkten VEGF-Ausschüttung und damit zur Bildung neuer Gefäße.^[109] Aus diesem Grund wird bereits der Einsatz einer kombinierten photodynamischen, antiangiogenen Therapie mit verschiedenen Wirkstoffen untersucht.^[110] Auch der Rhenium-Komplex SEK030 und seine optimierte Variante KWPS16 haben Kinaseinhibierende Eigenschaften. In diesem Fall wird die zytosolische Kinase Pim1 mit einem IC₅₀-Wert von 84 nM bzw. 75 nM bei gleichzeitiger Anwesenheit von 10 µM ATP in ihrer Aktivität eingeschränkt.^[139] Auch Pim1 steht in Verdacht mit einer Reihe von Krebserkrankungen in Verbindung zu stehen und seine Inhibition bietet daher ebenfalls gute Voraussetzungen für eine duale Wirkung der Komplexe bei der Behandlung von Tumorzellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass es möglich ist, mit Pyridocarbazol-basierten Iridium- und Rhenium-Komplexen einen photozytotoxischen Effekt in Krebszellen zu erzeugen, der in seiner zellulären Wirkung ähnlich zu dem, bekannter Porphyrin-basierter Photosensibilisatoren ist. Zwar erreichen die hier vorgestellten Komplexe nicht die hohen Anregungswellenlängen der Photosensibilisatoren aus der zweiten oder dritten Generation der PDT, dafür bieten sie jedoch eine völlig neue Möglichkeit die photodynamische Wirkung mit der Inhibition von Kinasen zu verbinden. Ob dieser vielversprechende Ansatz auch einer *in vivo* Anwendung standhält und die hier gezeigten Metallkomplexe tatsächlich eine Konkurrenz zu den bereits existierenden Photosensibilisatoren sind, können jedoch erst weiterführende Versuche zeigen. Ein erster Schritt in diese Richtung ist der derzeit durchgeführte *Drug-like-ability*-Test der Firma Novartis für den Komplex KW164. Hierbei sollen die generelle Bioverfügbarkeit und die metabolische Stabilität der Verbindung untersucht werden. Einen tatsächlichen Beweis für eine

synergistische Wirkung aus Photozytotoxizität und Kinaseinhibition können jedoch erst *in vivo* Untersuchungen an einem geeigneten Tumormodel bringen.

Unabhängig vom weiteren Einsatz der hier gezeigten Komplexe, hat diese Arbeit dazu beigetragen, ein grundlegendes Verständnis der essentiellen Strukturelemente Pyridocarbazol-basierter Photosensibilisatoren zu entwickeln und den Einfluss verschiedener Modifikationen auf die photodynamische Wirkung der Verbindungen abzuschätzen. Ausgehend von den hier gezeigten Ergebnissen und dem bereits zuvor etablierten Wissen über das Design organometallischer Kinaseinhibitoren, sollte es möglich sein, weitere Komplexe dieser Art herzustellen und dabei auch das Spektrum der adressierten Kinasen auszudehnen. Ein aussichtsreicher Kandidat könnte hierbei der Ruthenium-Komplex SW010a sein, für den bereits ebenfalls eine photozytotoxische Wirkung in HeLa-Zellen nachgewiesen werden konnte.

Als ein weiteres, interessantes zukünftiges Projekt könnte der Versuch unternommen werden den, in dieser Arbeit gezeigten Rhenium-Komplex SEK030, in einer analogen Weise zur bereits durchgeführten Biotin-Markierung, mit einem Tumor-spezifischen Zielmoleküle, wie z.B. der Folsäure, zu koppeln. Der Rezeptor dieses Vitamins wird auf der Oberfläche zahlreicher Krebszellen exprimiert und könnte daher dazu beitragen, die Selektivität des Komplexes für entartete Zellen deutlich zu erhöhen.^[181]

In Bezug auf die zelluläre Wirkungsweise gilt es die hier gezeigten möglichen Wege der Apoptose weiter abzusichern. Hierzu zählt vor allem ein Nachweis der Cytochrom c Ausschüttung sowie die Erstellung eines Aktivitätsprofils zahlreicher weiterer Proteine des Apoptosesignalwegs. Für die Durchführung der hierfür notwendigen Western-Blot-Analysen müsste jedoch zunächst eine neue Art der Belichtung für die Zellen gefunden werden, da die momentan bestrahlte Fläche nicht groß genug ist, um eine ausreichende Menge apoptotischer Zellen zu erzeugen.

5 Experimentalteil

5.1 Geräte und Materialien

5.1.1 Geräte

Absaugsystem	Vacuspip	Integra Biosciences
Brutschrank	Galaxy 170 S	New Brunswick
Durchflusszytometer	Attune Acoustic Focusing Cytometer	Applied Biosystems
Inkubationsschüttler	Multitron II	Infors HT
Labor-Schüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf
Laser Scanning Mikroskop	Axiovert 200 M	Carl Zeiss
Scanning Modul Objektiv	LSM 510 META Plan-Apochromat 63x/1.40 oil DIC M27	
LED-Reflektor	PAR16 GU10 LR0707-SP	Megaman
Microplate Reader	SpectraMax M5	Molecular Devices
Mikroskope	Eclipse TS 100	Nikon
	Axiovert 200 M	Carl Zeiss
Photodiode	Si-Photodiode	Hamamatsu
Sterilwerkbank	MSC-Advantage	Thermo Scientific
Szintillationsdetektor	LS6500	Beckman Coulter
<i>xCELLigence</i>	RTCA SP	Roche Applied Science
Xe/Hg-Bogenlampe	Arc Lamp Housing, Two Element Fused Silica, F/1, Collimated, 50-500 W	Newport
UV-Lampe	Deep UV Lamp, 200 W, UXM 200HO	USHIO
Netzgerät	50 -200 W, Model 69902	Newport
Lichtabschirmung	Model 71311	Newport
Flüssigkeitsfilter	Aluminium, 1.5 Inch Serie, Model 61945	Newport
Manueller Verschluss	Model 71430	Newport
Filterhalterung	Model 71260	Newport
Spiegelhalterung + Spiegel	Model 66245 und 66215	Newport
Zählkammer	Neubauer Bright-Line, 0.1mm Tiefe	Optik Labor
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf

5.1.2 Puffer und Chemikalien

Apo-ONE Homogeneous Caspase 3/7 Assay	Promega	G7790
ATP	AppliChem	A1348,0010
[γ - ³³ P]ATP ,EasyTides	Perkin Elmer	NEG602H
Carboxy-H ₂ DFFDA	Invitrogen	C-13293
Caspase-Glo 3/7 Assay	Promega	G8091
Caspase-Glo 8 Assay	Promega	G8201
3D-Angiogenesis Assay	PromoCell	C-13010
24-well Platte mit 8 Assays Medium VEGF Lösung		
DAPI	Invitrogen	D3571
DiOC6	Invitrogen	D273
DMEM-low glucose	Sigma	D6046
DMEM ohne Phenolrot	Sigma	D5921
DMSO	Sigma	41639
FBS	Sigma	F6178
Gentamicin	Sigma	G1397
HBSS	Sigma	H8264
L-Glutamin	Sigma	G7513
MTT	Sigma	M5655
PBS	Sigma	D8537
PBS mit Mg ²⁺ /Ca ²⁺	Sigma	D8662
Penicillin (10,000 Units/mL)-Streptomycin (10 mg/mL)	Sigma	P4333
Pim 1, rekombinant exprimiert in <i>E.coli</i>	Millipore	14-573
Pim1 Substrat P70 S6 (KKRNRTLTV)	AnaSpec	63865
RPMI-1640	Sigma	R0883
Szintillationsflüssigkeit, Rotiszint eco plus	Carl Roth	0016.3
tert-Butylhydroperoxid, 70 % in H ₂ O	Sigma	458139
α -Tocopherol	Sigma	258024
Trypsin-EDTA Lösung 0.05 %	Sigma	59417C
WGA	Invitrogen	W849

5.1.3 Verbrauchsmaterialien

μ -Slide 8 well	Ibidi	80826
6-well Mikrotiterplatten	BD Falcon	734-0019 (VWR)
12-well Mikrotiterplatten	BD Falcon	391-0006 (VWR)
96-well Mikrotiterplatten, klar	BD Falcon	734-0023 (VWR)
96-well Mikrotiterplatten, schwarz	FluoroNunc	732-2699 (VWR)
96-well Mikrotiterplatten, schwarz, optischer Boden	Nunclon	732-2604 (VWR)
96-well Mikrotiterplatten, weiß	LumiNunc	732-2696 (VWR)
Kryogefäße 1,6 mL	Sarstedt	72.380.002
Serologische Pipetten	VWR	612-1245, 612-1248, 612-1270
Szintillationsgefäße (Mini Poly-Q Vial)	Beckman Coulter	592928
Whatman-Filterpapiere P81, 2,1 cm	GE Healthcare	3698-321
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	BD Falcon	734-0050 (VWR)
Zentrifugenröhrchen, 15 mL	Sarstedt	62.554.002

5.1.4 Metallkomplexe

Die in dieser Arbeit eingesetzten Metallkomplexe wurden von Doktoranden und Studenten der Arbeitsgruppe MEGGERS hergestellt und von diesen für die hier gezeigten Untersuchungen in Form von 10 mM Stocklösungen in DMSO zur Verfügung gestellt. Alle Komplexe sind mit einem System aus Buchstaben und Zahlen gekennzeichnet, wobei der zwei- bis vierstellige Buchstaben-code auf die jeweilige Person verweist, die diese Verbindung synthetisiert hat. Die Zahlen entsprechen der gewählten Nummerierung der Komplexe durch die Hersteller und wurden für diese Arbeit übernommen.

Abkürzung	Person die die Verbindung synthetisiert hat
AW	Alexander Wilbuer
ASSD	Arne Schröder (Vertiefungsstudent angeleitet von Sandra Dieckmann)
FL	Li Feng
KW	Kathrin Wähler
KWPS	Patrick Szabo (Bachelorstudent angeleitet von Kathrin Wähler)
NP	Nick Pagano
SEK	Sandra Dieckmann
SW	Sebastian Weber (Bachelorstudent angeleitet von Elisabeth Martin)

5.2 Methoden

5.2.1 Zellkultivierung

Die in dieser Arbeit eingesetzten Zellen wurden in Kulturgefäßen mit einer Fläche von 75 cm², in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37 °C, kultiviert. Alle mit den Zellen durchgeführten Arbeiten wurden in einer keimfreien Umgebung unter einer Sterilwerkbank vollzogen.

5.2.1.1 Eingesetzte Zelllinien

HeLa:

Als Standardzelllinie für die Versuche dieser Arbeit wurde die humane Zervixkarzinomlinie HeLa eingesetzt. Diese geht auf eine 1951 entnommene Gewebeprobe eines Gebärmutterhalstumors der Patientin HENRIETTA LACKS zurück und ist damit die älteste kultivierte, menschliche Zelllinie. Seit über 60 Jahren dient sie als Modellorganismus in der biologischen und medizinischen Forschung und ist Bestandteil von über 70,000 Publikationen.^[182] Einige der bedeutendsten Arbeiten, an denen HeLa-Zellen beteiligt waren, sind die Entwicklung des Impfstoffs gegen Polio sowie die Erforschung der Zusammenhänge zwischen dem humanen Papillom Virus (HPV) und der Entstehung von Gebärmutterhalskrebs. Einer der Ausschlag gebenden Faktoren für die Entartung der Zellen war eine Infektion mit HPV-18 und die daraus resultierende Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 durch ein virales Onkogen.^[183,184] Die in dieser Arbeit eingesetzten HeLa-Zellen stammen aus der *European Collection of Cell Cultures* (ECACC) und wurden 2007 erstmals kultiviert.

Weitere eingesetzte humane Zelllinien:

	Ursprungsgewebe	Anmerkung
HT29	Colon Adenokarzinom	multiresistent
HepG2	Leberzellkarzinom	
WM3918	Melanom	
1205Lu	Melanom	BRAF-Mutante
HUVEC	Nabelschnurvene	Primärzellen / Angiogenesemodell

Die HT29- und HepG2-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe OCKER des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg zur Verfügung gestellt. Die WM3918- und 1205Lu-Zellen entstammen der Kollektion des *Wistar Institutes* in Philadelphia und wurden dort für die 3D-Sphäroid Versuche eingesetzt. Die primären HUVECs wurden von PromoCell als bereits kultivierte Sphäroide bezogen.

5.2.1.2 Zellkulturmedium

Für die Kultivierung der HeLa-Zellen wurde *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) in der *low glucose*-Form verwendet. Dieses wurde vor dem Gebrauch mit 10 % fetalem Rinderserum (FBS) versetzt, um den Zellen die notwendigen Wachstumsfaktoren zur Verfügung zu stellen. Daneben wurden die Antibiotika Penicillin (100 units/mL) und Streptomycin (100 µg/mL) zugefügt sowie die Aminosäure L-Glutamin in einer Endkonzentration von 2 mM. Letztere dient dazu, den erhöhten Energie- und Stickstoffbedarf der schnell wachsenden Zellen zu decken.

HT29- und HepG2-Zellen wurden in RPMI-1640 Medium kultiviert. Dieses wurde ebenfalls mit 10 % FBS sowie 2 mM L-Glutamin versetzt. Anders als beim DMEM wurde hier allerdings zusätzlich zu den Antibiotika Penicillin und Streptomycin auch noch Gentamicin in einer Konzentration von 100 µg/mL zugefügt.

5.2.1.3 Subkultivierung

Die Subkultivierung umfasst das Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden sowie die anschließende Überführung eines gewissen Teils der erhaltenen Zellsuspension in frisches Nährmedium. Sie dient sowohl der Erhaltung einer optimalen Wachstumsrate, als auch der Versorgung der Zellen mit neuen Nährstoffen. Der beste Zeitpunkt für die Subkultivierung ist erreicht, wenn ca. 80-90 % des Kulturflaschenbodens mit Zellen bedeckt sind. Anhand dieser Richtlinie wurden die für diese Arbeit kultivierten Zellen alle 2-3 Tage passagiert. Hierzu wurde zunächst das alte Medium mit einem Absaugsystem entfernt und die Zellen mit 6 mL PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 4 mL Trypsin bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Trypsin ist eine Peptidase, die die Oberflächenproteine eukaryotischer Zellen spaltet und dadurch deren Bindung zum Untergrund aufhebt. Nach der kompletten Ablösung der Zellen wurde der Vorgang durch die Zugabe von 4 mL Medium gestoppt und die gesamte Suspension in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Um das Trypsin wieder zu entfernen, wurden die Zellen für 5 min bei 1000 rpm und 20 °C zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Zellpellet wurde in ca. 5 mL frischem Kulturmedium resuspendiert. Etwa 10-20 % dieser Zellsuspension wurden dann, in Abhängigkeit von der Größe des erhaltenen Zellpellets, in ein neues Kulturgefäß mit 25 mL frischem, vorgewärmten Medium überführt. Hierin wurden die Zellen bis zu einer erneuten Dichte von 80-90 % kultiviert.

5.2.1.4 Kultivierung in Mikrotiterplatten

Die Kultivierung in Mikrotiterplatten dient der besseren Zugänglichkeit der Zellen bei der Durchführung von Versuchen. Zudem gestattet sie quantitative Auswertungen, indem sie die Möglichkeit bietet, identisch große Reaktionsräume, die die gleiche Anzahl kultivierter Zellen

enthalten, miteinander zu vergleichen. Hierbei besteht, je nach Versuchsaufbau, die Auswahl zwischen Platten mit 6 bis hin zu 1536 Kavitäten (*wells*), was dementsprechend unterschiedliche zur Verfügung stehende Reaktionsvolumina mit sich bringt.

Für die Überführung der Zellen auf die Mikrotiterplatten, wurden diese, genau wie bei der Subkultivierung, zunächst mit Trypsin vom Substrat gelöst und anschließend abzentrifugiert. Das dabei erhaltene Zellpellet wurde in ca. 5 mL frischem Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellkonzentration dieser Suspension, wurden 70 μL einer 1:10 Verdünnung auf eine Neubauer-Zählkammer aufgebracht. Anhand des Mittelwerts der vier ausgezählten Quadranten mit einem Volumen von 0.1 μL wurde dann die Zellzahl/ μL der Ursprungssuspension bestimmt. Basierend auf dieser Größe wurde im nächsten Schritt eine Verdünnung aus frischem Medium und der Zellsuspension erstellt, die exakt der gewünschten Konzentration für den Versuch entsprach. Diese Verdünnung wurde schließlich auf die Mikrotiterplatte aufgebracht. Bei den 96-*well* Platten wurden nur die inneren 60 *wells* der Platte gefüllt, während die äußere Reihe mit 200 μL reinem Medium ohne Zellen versehen wurde. Der Grund hierfür ist die hohe Verdunstungsrate der äußeren *wells*, die zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen kann. Um ein ausreichendes Anwachsen der Zellen auf ihrem neuen Substrat zu gewährleisten, wurden die Platten vor einer weiteren Behandlung für mindesten 24 h im Brutschrank inkubiert.

5.2.1.5 Konservierung

Eine Konservierung ist in der Zellkultur entscheidend, um den ursprünglichen Genotyp einer Zelllinie zu erhalten. Besonders Krebszellen neigen dazu, sich im Laufe der Kultivierung zu verändern, was bis hin zu einer erhöhten Chromosomenzahl führen kann. Ein Teil der frisch kultivierten Zellen sollte daher immer bereits nach wenigen Wochen wieder als Reserve eingefroren werden. Für diesen Vorgang wurden die Zellen zunächst mit Trypsin vom Substrat gelöst und anschließend abzentrifugiert. Das Zellpellet aus einer 75 cm^2 Kulturflasche wurde dann in 3-3.5 mL Medium, versetzt mit zusätzlichen 10 % FBS sowie 10 % DMSO, resuspendiert und auf spezielle Kryogefäße (1.6 mL) verteilt. Diese wurden im direkten Anschluss für 3-4 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und danach in einen $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Schrank überführt.

Für das Auftauen der Zellen wurden die Kryogefäße für 3 min in ein Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten und anschließend unter der Sterilwerkbank geöffnet und ihr Inhalt in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen mit 5 mL Medium überführt. Um das zum Einfrieren verwendete DMSO wieder zu entfernen, wurden die Zellen zunächst für 2 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das Pellet nach dem Entfernen des Überstands in etwa 3 mL frischem Medium resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde komplett in ein neues Kulturgefäß mit 23 mL Medium überführt und für mehrere Tage im Brutschrank inkubiert.

5.2.2 Belichtungsaufbau

Die für diese Arbeit notwendigen Belichtungen wurden mit zwei unterschiedlichen Leuchtmitteln durchgeführt. Das eine ist eine 200 W Xenon/Quecksilber-Bogenlampe der Firma Newport mit einem speziellen Filteraufbau (Abbildung 47). Der Kern der Einheit befindet sich im luftgekühlten Lampengehäuse, von wo aus das Licht über Spiegel konzentriert und auf einen Flüssigkeitsfilter gelenkt wird. Diese mit destilliertem Wasser gefüllte Einheit absorbiert den Infrarot-Anteil des Lichts und verhindert somit ein Aufheizen der Zellen während der Belichtungsphase. Die Wärme, die am Flüssigkeitsfilter selbst entsteht, wird über eine einfache Wasserkühlung abgeleitet. Um die Bandbreite des Lichts im Versuch zu variieren, passiert dieses im nächsten Element einen Ordnungsfiler, der den durchlässigen Wellenlängenbereich nach unten hin begrenzt. Je nach Fragestellung kann so mit ultraviolettem und sichtbarem oder rein sichtbarem Licht gearbeitet werden. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden *Cut-on* Filter mit verschiedenen unteren Transmissionsgrenzen von 330, 415, 450 und 505 nm eingesetzt (Tabelle 4). Die angegebenen Wellenlängen entsprechen dabei dem Punkt des Filters, an dem mindestens 75 % der maximalen Transmission erreicht werden. Nach dem das Licht auch diesen Filter durchlaufen hat, wird es von einem Spiegel nach unten auf die Mikrotiterplatte mit den kultivierten Zellen reflektiert. Die dabei bestrahlte Fläche ist groß genug, um etwa neun *wells* einer 96-*well* Platte mit gleicher Intensität zu belichten. Die Bestrahlungsstärke, die unter diesen Bedingungen bei den Zellen ankommt, wurde mit einer Photodiode gemessen. Sie beträgt für den 330 nm Filter 52.8 mW/cm², für den 415 nm Filter 33.8 mW/cm² und für den 505 nm Filter 29.2 mW/cm².

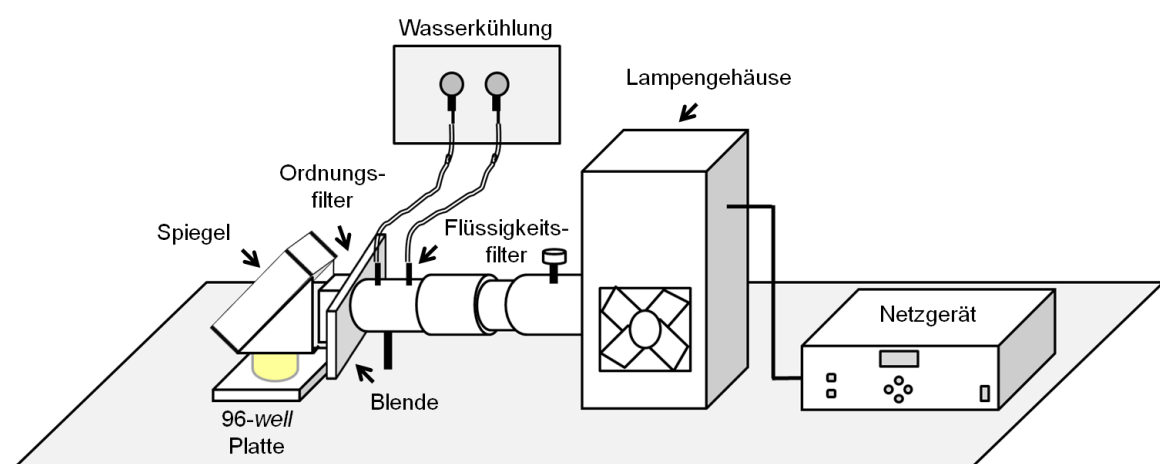


Abbildung 47: Aufbau der Belichtungsapparatur: Die im Lampengehäuse befindliche Xe/Hg-Bogenlampe wird von einem Netzgerät mit 200 W betrieben. Vor dem Auftreffen auf der Zell-Platte wird das Licht mehrfach gefiltert. Ein Flüssigkeitsfilter absorbiert zunächst den Infrarot-Anteil, bevor ein variabler Ordnungsfiler den genauen Transmissionsbereich des Lichts festlegt. Am Ende wird das Licht mit Hilfe eines Spiegels auf die Zellen reflektiert. Eine verschiebbare Blende zwischen Flüssigkeits- und Ordnungsfiler ermöglicht eine kurzzeitige Unterbrechung des Lichtstrahls.

Tabelle 4: Ordnungsfiler von Newport zur Eingrenzung des Transmissionsbereichs der verwendeten Leuchtmittel. **Cut-on:** Wellenlänge bei der 50 % der maximalen Transmission erreicht sind. **Transmissionsbereich:** Bereich in dem mindestens 75 % der maximalen Transmission erreicht wird.

Filter	Cut-on	Transmissionsbereich	Art. Nr.
$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	330 nm	N.V.	/
$\lambda \geq 415 \text{ nm}$	400 nm	415-2750 nm	59472
$\lambda \geq 450 \text{ nm}$	435 nm	450-2780 nm	59482
$\lambda \geq 505 \text{ nm}$	495 nm	505-2750 nm	59492
$\lambda \geq 560 \text{ nm}$	550 nm	560-2750 nm	59502
$\lambda \geq 580 \text{ nm}$	570 nm	580-2750 nm	59510
$\lambda \geq 620 \text{ nm}$	610 nm	620-2750 nm	59512

Die zweite eingesetzte Lampe ist ein handelsüblicher 7 W LED-Reflektor von Megaman, der immer dann eingesetzt wurde, wenn eine mobile Beleuchtungseinheit benötigt wurde bzw. in den Fällen in denen eine Belichtung mit Wellenlängen deutlich oberhalb von 500 nm erforderlich war. Der Reflektor wurde in einem Abstand von 6-8 cm über den kultivierten Zellen platziert. Auch in diesem Fall wurden Filter von Newport mit unteren Transmissionsgrenzen von 505, 560, 580 und 620 nm eingesetzt, um das Spektrum der Lampe zu variieren (Tabelle 4). Die Bestrahlungsstärke der LED kann aufgrund des breiten, kontinuierlichen Spektrums allerdings nur ungefähr kalkuliert werden und liegt bei maximal 45.8 mW/cm^2 .

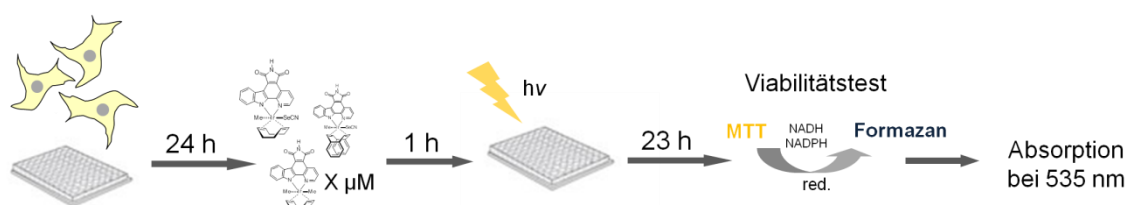
Entscheidend für die eingesetzten Belichtungsvarianten ist, dass sie einen möglichst geringen Einfluss auf die Viabilität der Zellen besitzen. Alle Belichtungszeiten wurden daher so gewählt, dass eine minimale Zellüberlebensrate von 70 % während der Versuche nicht unterschritten wurde. Dies zeigen die Kontrollexperimente an HeLa-Zellen in Tabelle 5. Für Versuche, die mit der Kombination aus Xe/Hg-Bogenlampe und dem 330 nm *Cut-on* Filter durchgeführt wurden, wurde eine Belichtungszeit von 15 min nicht überschritten, da hier die Zellviabilität bereits bis auf 79.2 % (± 7.1) abgesunken war. Bei einer Belichtung mit $\lambda \geq 415 \text{ nm}$ für 60 min sinkt die Viabilität der Zellen auf 72.1 % (± 4.9) und bei einer Belichtung der gleichen Dauer mit $\lambda \geq 450 \text{ nm}$ auf 77.1 % (± 5.9). Kein Einfluss auf die Zellviabilität ergibt sich bei einer 60-minütigen Belichtung bei $\lambda \geq 505 \text{ nm}$ ($103.8 \% \pm 8.7$) oder dem Einsatz der LED ($108.7 \% \pm 8.5$).

Tabelle 5: Einfluss verschiedener Belichtungsvarianten auf die Viabilität kultivierter HeLa-Zellen.

Lampe	Wellenlänge	Belichtungszeit	Zellviabilität
Xe/Hg-Bogenlampe	$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	15 min	79.2 % (± 7.1)
	$\lambda \geq 415 \text{ nm}$	60 min	72.1 % (± 4.9)
	$\lambda \geq 450 \text{ nm}$	60 min	77.1 % (± 5.9)
	$\lambda \geq 505 \text{ nm}$	60 min	103.8 % (± 8.7)
LED	ohne Filter	60 min	108.7 % (± 8.5)

5.2.3 Nachweis photoinduzierter Zytotoxizität

Für den Nachweis einer photoinduzierten Zytotoxizität der untersuchten Metallkomplexe wurden zunächst HeLa-Zellen in einer Zellzahl von 9000 Zellen/*well* oder HT29-Zellen in einer Zahl von 20,000 Zellen/*well* auf einer 96-*well* Platte ausgesät. Nach einer Inkubation von 24 h im Brutschrank wurden dann die entsprechend verdünnten Metallkomplexe zugegeben und für eine weitere Stunde gemeinsam mit den Zellen inkubiert. Danach wurde ein Teil der behandelten Zellen belichtet, während der Rest abgedeckt wurde und als spätere Dunkelkontrolle diente. 24 h nach der Zugabe der Komplexe wurde die Viabilität der Zellen mit Hilfe eines MTT-Tests bestimmt (Schema 4). Aus einem Vergleich der Viabilität komplett unbehandelter Zellen mit der Dunkelkontrolle sowie den belichteten Zellen, wurden dann Rückschlüsse auf die Photozytotoxizität der Verbindung gezogen.



Schema 4: Zeitlicher Ablauf des Nachweises photoinduzierter Zytotoxizität, ausgelöst durch organometallische Komplexe.

Von einem Austausch des Mediums vor der Belichtung, um bis dahin nicht in die Zelle aufgenommene Komplexe zu entfernen, wurde abgesehen. Ein solcher Austausch wäre notwendig, wenn auch die extrazellulären Komplexe einen Einfluss auf den zytotoxischen Effekt hätten. Dies konnte allerdings mit einem einfachen Versuch ausgeschlossen werden. Hierzu wurde für die Verbindung SEK030 eine zweite Bestimmung des EC_{50} -Werts durchgeführt, bei der das Medium mit dem Komplex vor der Belichtung entfernt und gegen frisches ausgetauscht wurde. Das Ergebnis dieses Versuchs war ein EC_{50} -Wert von $0.18 \mu\text{M}$ (± 0.02). Ohne einen vorherigen Medientausch liegt der Wert bei $0.12 \mu\text{M}$ (± 0.03). (Die einzelnen Messwerte der Kurven befinden sich im Anhang in Tabelle 18.) Das zeigt, dass extrazellulär lokalisierte Komplexe, unter Berücksichtigung der Messgenauigkeit, so gut wie keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Versuche haben. Aus praktischen Gründen wurde daher von einem Austausch des Mediums vor der Belichtung abgesehen. Dies hat gleichzeitig den Vorteil, dass die Viabilität der Zellen der Dunkelkontrolle, die somit über einen Zeitraum von 24 h dem Komplex ausgesetzt sind, ein deutlich besseres Bild der Toxizität der Verbindung widerspiegelt.

5.2.3.1 Inkubation der Metallkomplexe

Alle in dieser Arbeit verwendeten organometallischen Komplexe wurden, ausgehend von einer 10 mM Stocklösung in DMSO, für den weiteren Einsatz in den biologischen Versuchen verdünnt. Für den Nachweis einer Photozytotoxizität wurde der entsprechende Komplex zunächst in der doppelten Menge der gewünschten Konzentration in Zellkulturmedium gelöst. Dabei wurde darauf geachtet, dass der DMSO-Anteil dieser Lösung für alle Versuche konstant bei 2 % lag. 100 μ L dieser Verdünnung wurden dann zu den bereits vorhandenen 100 μ L Medium, in die *wells* der 24 h zuvor ausgesäten Zellen, pipettiert. Durch diesen Schritt halbiert sich sowohl die vorherrschende Komplexkonzentration, als auch der DMSO-Anteil im Medium, während des eigentlichen Versuchs. Das Pipettierschema der Platte ist in Abbildung 48 dargestellt. Insgesamt wurden nur 18 *wells* mit dem Komplex versehen. Die eine Hälfte dieser *wells* wurde im späteren Verlauf des Versuchs belichtet, während die andere Hälfte als Dunkelkontrolle diente. Alle restlichen *wells* wurden mit 100 μ L einer 2 %igen DMSO-Lösung in Medium befüllt und dienten als Referenz für eine 100 %ige Zellviabilität. Während der Belichtung wurde die komplette linke Hälfte der Platte abgedeckt.

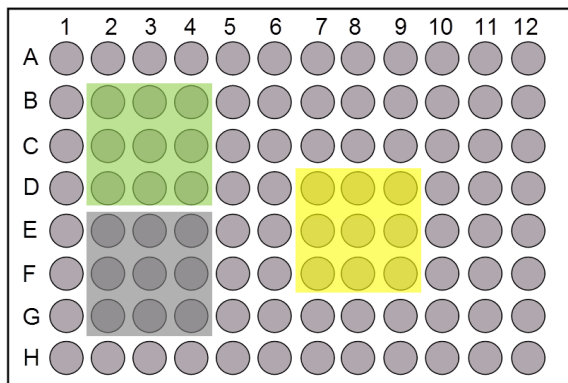
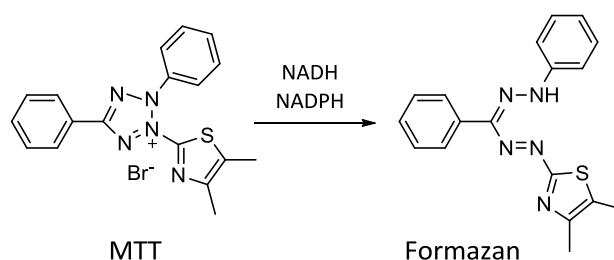


Abbildung 48: Pipettierschema eines Versuchs zum Nachweis einer photozytotoxischen Wirkung von Metallkomplexen. Die äußerste Reihe der *wells* wurde freigelassen und mit 200 μ L reinem Medium gefüllt, um ein verdunsten von Flüssigkeit aus den für die Messung relevanten *wells* zu verhindern. **Grau unterlegt:** *wells* mit unbehandelten Zellen (repräsentieren eine 100 %ige Viabilität); **grün unterlegt:** unbelichtete Zellen + Metallkomplex; **gelb unterlegt:** belichtete Zellen + Metallkomplex.

5.2.3.2 Viabilitätstest

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde ein MTT-Test durchgeführt. Dieser basiert auf der Reduktion des Tetrazoliumsalzes Methylthiazoltetrazoliumbromid (MTT) durch die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH. Beide werden im Zuge des zellulären Stoffwechsels während der Glycolyse, dem Citratzyklus oder dem Penthosephosphatweg gebildet und ihre Reduktionskraft steht daher in direktem Zusammenhang zur Viabilität der Zelle. Durch die Reduktion wird aus dem gelben, wasserlöslichen MTT das blau-violette, wasserunlösliche Formazan (Schema 5). Die Intensität des gebildeten Farbstoffs ist dabei proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven Zellen und lässt sich mit Hilfe der charakteristischen Absorption des Formazans bei 535 nm quantitativ bestimmen.



Schema 5: Reduktion des gelben Methylthiazolotetrazoliumbromid durch intrazelluläres NADH und NADPH zum blau-violetten Formazan.

Für die Durchführung des Tests wurde das als Pulver vorliegende, lichtempfindliche MTT zunächst in PBS gelöst (0.5 % (w/v)). Die erhaltene Lösung wurde sterilfiltriert und anschließend 1:11 mit Zellkulturmedium verdünnt. In dieser Form wurde das MTT mit den kultivierten Zellen inkubiert. Hierzu wurde das in den *wells* befindliche Medium entfernt und durch 200 µL der MTT-Lösung ersetzt. Dies wurde nicht nur für die 60 mit Zellen versehenen *wells* durchgeführt, sondern auch für sechs Rand-*wells* in denen sich keine Zellen befanden (Blindprobe). Danach wurde die Platte für 3 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 155 µL der MTT-Lösung abgenommen und durch 90 µL DMSO ersetzt. Dieser Schritt dient der Zerstörung der Zellen und sorgt dafür, dass sich das gebildete Formazan gleichmäßig im ganzen *well* verteilen kann. Um diesen Vorgang zu unterstützen, wurde die Platte zusätzlich für 10 min bei 37 °C und 150 rpm in einem Inkubationsschüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 535 nm mit einem *Microplate Reader*.

Für die Auswertung wurden zunächst die erhaltenen Absorptionswerte der Blindprobe gemittelt. Der erhaltene Wert wurde dann von allen anderen Absorptionswerten als Hintergrundabsorption abgezogen. Anschließend wurden die Werte der 100 %-Kontrolle gemittelt. Hierfür wurden neun *wells* ausgewählt, deren Zellen lediglich mit 1 % DMSO behandelt wurden. Basierend auf diesem Absorptionswert, der eine hundertprozentige Zellviabilität repräsentiert, wurden die Überlebensraten der Zellen in den übrigen *wells* nach der unten stehenden Gleichung berechnet.

$$\text{Zellviabilität (\%)} = \frac{(\text{gemessene Absorption des } wells - \text{Blank}) \times 100}{(\text{Ø Absorption der unbehandelten } wells - \text{Blank})}$$

Im Anschluss daran wurde der Mittelwert für alle gleichbehandelten *wells* gebildet und die entsprechende Standardabweichung berechnet. Für alle in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurde, soweit nicht anders vermerkt, die Zellviabilität von 18 *wells* gemittelt, die in zwei unabhängigen Experimenten zu je neun *wells* gemessen wurden. Ebenso wurde die Standardabweichung auf der Basis dieser 18 *wells* berechnet.

5.2.3.3 Bestimmung des EC₅₀-Werts

Für die Bestimmung der EC₅₀-Werte in dieser Arbeit, wurde zunächst der lichtabhängige und lichtunabhängige Einfluss der jeweiligen Metallkomplexe auf die Zellviabilität in einem Konzentrationsbereich von 0.01-100 µM bestimmt. Die dabei für jeden Komplex erhaltenen sieben bis neun Datenpunkte aus den MTT-Tests sowie ihre Standardabweichungen wurden mit Hilfe der Origin-Software einer Ausgleichsrechnung unterzogen. Die beste Anpassung an die gemessenen Daten konnte dabei mit einem sigmoidalen Fit der Funktion Logistik erzielt werden. Basierend auf dem erhaltenen Kurvenverlauf, wurde dann ebenfalls mit Hilfe der Software die halb maximale effektive Konzentration bestimmt, die für eine 50 %ige Zellüberlebensrate ausschlaggebend ist.

5.2.4 Echtzeit-Zellviabilitäts-Analyse

Die Echtzeit Viabilitäts Analyse wurde mit einem *xCELLigence* RTCA SP System der Arbeitsgruppe OCKER am Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg unter der Mithilfe von ANNA LENA MERKEL durchgeführt. Das *xCELLigence* System arbeitet mit speziellen 96-*well* Mikrotiterplatten, in deren Boden einzelne Goldelektroden eingearbeitet sind. Mit Hilfe dieser so genannten E-Platten ist es möglich, den Widerstand an jedem *well* individuell zu messen und dadurch Informationen über die Viabilität der Zellen in Echtzeit zu erhalten. Die entscheidende Größe, die das System dabei misst, ist die Kontaktfläche der kultivierten Zellen mit dem Plattenboden. Nimmt diese zu, so erhöht sich auch der gemessene Widerstand an der Elektrode. Das als Zellindex gemessene Signal ist daher umso größer, je mehr Zellen auf dem *well*-Boden angesiedelt sind. Folglich steigt das Signal in der anfänglichen Wachstumsphase nach dem Aussäen der Zellen besonders stark an. Jedoch ist nicht nur die Anzahl der Zellen ausschlaggebend für die Stärke des Signals, auch die Kontaktfläche, die jede einzelne Zelle mit dem Boden ausbildet, ist entscheidend. Diese ist besonders groß bei gesunden Zellen. Gestresste Zellen neigen hingegen dazu eine runde, kompaktere Struktur anzunehmen, mit einer geringeren Kontaktfläche zum Untergrund. Im Falle eines Zelltods kommt es schließlich zur kompletten Ablösung der Zellen vom Untergrund und damit zu einem drastischen Abfall des gemessenen Signals.

Für den Versuch wurden HeLa-, HT29- und HepG2-Zellen in einer Dichte von 10,000 Zellen/*well* auf einer 96-*well* E-Platte ausgesät, nachdem das Gerät zuvor mit der gleichen Platte ohne Zellen und 50 µL des entsprechende Mediums geeicht wurde. Die ausgesäten Zellen wurden für 24 h im Brutschrank unter ständiger Aufzeichnung des Zellindex inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und durch 150 µL einer, ebenfalls in Medium verdünnten, Lösung des

Komplexes SEK030 ersetzt. Die Platte wurde daraufhin erneut in das im Brutschrank befindliche *xCELLigence* System gestellt und der Zellindex auf einen Wert von eins normiert. Nach einer weiteren Stunde wurde ein Teil der Platte für 60 min mit einem LED-Reflektor belichtet. Die Datenaufzeichnung wurde auch nach der Belichtung für weitere 24 h fortgesetzt. Anhand des gemessenen Zellindex konnten anschließend Rückschlüsse über das Adhäsionsverhalten der Zellen und damit ihre Viabilität während der gesamten Versuchsdauer gezogen werden.

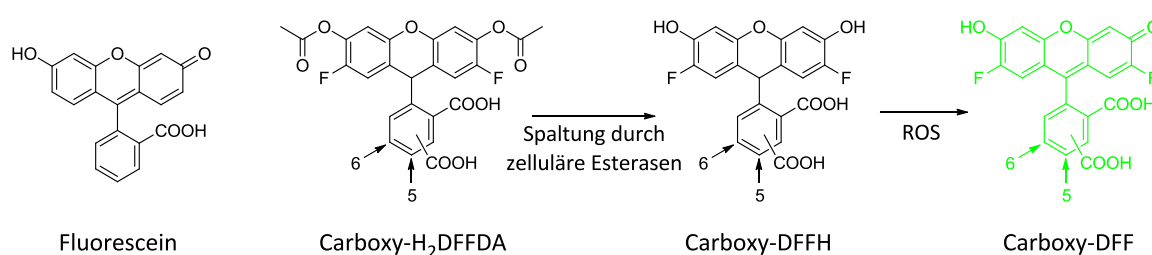
5.2.5 Fluoreszenzfärbungen

Für die morphologischen Studien der photodynamisch behandelten Zellen, wurden HeLa-Zellen in einer Zahl von 10,000 Zellen/*well* auf einem Zellkultur-Biochip (*μ-slide*) mit acht Kammern ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert und anschließend mit dem Komplex SEK030 behandelt. Hierzu wurde das alte Medium aus den Kammern abgenommen und durch 200 μ L einer 1 μ M Verdünnung des Komplexes in frischem Medium, versetzt mit 1 % DMSO, ersetzt. Nach einer Stunde Inkubation, wurde ein Teil der Zellen für 15 min mit einem LED-Reflektor belichtet, während die Kontrollzellen direkt für die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop vorbereitet wurden. Für die entsprechenden Färbungen wurden die Zellen zunächst mit HBSS gewaschen und anschließend mit 80 μ g/mL WGA-TMR (Tetramethylrhodamin konjugiertes *wheat germ agglutinin*) und 100 μ M DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) behandelt. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten direkt zum, in den Kammern befindlichen, HBSS-Puffer pipettiert. Während das WGA für 25 min inkubiert wurde, betrug die Inkubationszeit des DAPI-Farbstoffs nur 5 min. Anschließend wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und in 200 μ L frischem Puffer aufgenommen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mit einem Axiovert 200 M Laserscanmikroskop von Carl Zeiss mit der entsprechenden ZEN 2008 Software.

5.2.6 Intrazelluläre Detektion reaktiver Sauerstoffspezies

Der Nachweis intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies erfolgte mit dem speziell für diese Zwecke entwickelten Nachweisreagens 5-(und 6)-Carboxy-2',7'-difluorodihydrofluoresceindiacetat (Carboxy-H₂DFFDA). Dies ist eine modifizierte Variante des Fluoreszenzfarbstoffs Fluorescein. Die beiden Acetylgruppen dienen dabei zunächst einer Inaktivierung der Verbindung und werden in der Zelle durch die dortigen Esterasen abgespalten. Die zusätzliche Carboxygruppe verhindert eine anschließende Rückdiffusion des Farbstoffs aus der Zelle. Im Gegensatz zu der ebenfalls häufig eingesetzten dichloro-Variante der Verbindung, erhöhen die beiden Fluorsubstituenten die Photostabilität des Farbstoffs und machen ihn daher zu einem

geeigneten Nachweisreagens für die Fragestellung dieser Arbeit. Carboxy-H₂DFFDA wird passiv von den Zellen aufgenommen und akkumuliert anschließend im Zytosol. Nach der Abspaltung der Acetylgruppen durch die Esterasen liegt der Farbstoff zunächst in seiner nicht-fluoreszenten, reduzierten Form vor. Diese kann nun von intrazellulären Sauerstoffradikalen angegriffen, oxidiert und in den grün fluoreszierenden Farbstoff Carboxy-DFF umgewandelt werden, welcher anschließend mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden kann (Schema 6). Die häufigsten Reaktionspartner der Verbindung sind Peroxyl-, Alkoxy-, Hydroxyl- und Carbonatradikale oder auch NO₂-Radikale. Nicht oxidiert werden kann die Verbindung durch H₂O₂ oder Superoxid-Anion.



Schema 6: Intrazelluläre Nachweisreaktion für reaktive Sauerstoffspezies mit dem Fluorescein-basierten Farbstoff Carboxy-H₂DFFDA.

Für die Durchführung des Versuchs wurden HeLa-Zellen in einer Konzentration von 18,000 Zellen/*well* in einer schwarzen 96-*well* Mikrotiterplatte mit optisch klarem Boden ausgesät. Für die Kultivierung wurde in diesem Fall ein DMEM-Medium ohne Phenolrot verwendet. Nach einer Inkubation von 24 h im Brutschrank, wurde das Medium abgenommen und durch 100 µL einer 10 µM Carboxy-H₂DFFDA-Lösung in PBS ausgetauscht. Um ein Ablösen der Zellen von Untergrund zu vermeiden, wurde dabei ein spezieller PBS-Puffer mit zusätzlichen Calcium- und Magnesiumionen verwendet. Das Nachweisreagens wurde für 1 h mit den Zellen im Brutschrank inkubiert und anschließend abgenommen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend für eine weitere Stunde mit einer Verdünnung des Komplexes SEK030 in frischem Medium inkubiert. Das Volumen betrug dabei 100 µL pro *well* und enthielt konstant für alle Verdünnungen einen Anteil von 1 % DMSO. Als Positivkontrolle wurde ein Teil der Zellen mit dem starken Oxidationsmittel *tert*-Butylhydroperoxid inkubiert. Die Zellen der Negativkontrolle wurden hingegen lediglich einer 1 %igen DMSO-Lösung in Medium ausgesetzt. Nach Ablauf der Stunde wurde ein Teil der Zellen für 45 min mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 505$ nm) belichtet. Im direkten Anschluss daran erfolgte die Auswertung mit einem *Microplate Reader* (Ex 492 nm / Em 527 nm). Die gemessene Fluoreszenz kann, nach Abzug der Blindprobe und der Negativkontrolle, als gesteigerte oxidative Belastung der Zellen interpretiert werden.

5.2.7 Zellzyklusanalyse

Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen lässt sich in konkrete einzelne Phasen gliedern. Er beginnt mit der G1-Phase, in der die Zelle wächst und sich auf die bevorstehende Teilung vorbereitet. In der anschließenden S-Phase beginnt die Replikation der DNA. Nach ihrem Abschluss erfolgt eine erneute Wachstumsphase (G2), die schließlich in die Mitose (M-Phase) übergeht. Ein charakteristisches Merkmal jeder einzelnen Phase ist der DNA-Gehalt der Zelle. Er entspricht in der G1-Phase dem normalen diploiden Chromosomensatz und steigt während der S-Phase kontinuierlich an, bis er sich in der G2-/M-Phase schließlich verdoppelt hat. Zellen, die sich nicht im Wachstum befinden und stattdessen den programmierten Zelltod durchlaufen, besitzen einen nukleären DNA-Gehalt unterhalb dessen der G1-Phase. Das liegt daran, dass die DNA während der Apoptose von Caspase-aktivierten DNasen gespalten wird und die einzelnen, dabei entstehenden Fragmente aus dem Zellkern hinaus diffundieren. Zellen mit dieser Eigenschaft werden unter der sub-G1 Phase zusammengefasst. Basierend auf diesen Überlegungen lässt sich, mit Hilfe einer Bestimmung des nukleären DNA-Gehalts, eine Aussage über die Phase des Wachstumszyklus einer Zelle treffen. Hierbei haben sich eine Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid (PI) und eine anschließende quantitative Auswertung mit Hilfe der Durchflusszytometrie als geeignete Methode in der Molekularbiologie durchgesetzt. PI ist eine Verbindung, die stöchiometrisch an Nukleinsäuren bindet und dabei ihre fluoreszierenden Eigenschaften verstärkt.

Für die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse wurden HeLa-Zellen in einer Konzentration von 60,000 Zellen pro *well* in 12-*well* Mikrotiterplatten kultiviert. Nach 24 h wurde dem Medium SEK030 (1 μM) sowie DMSO zu einem Anteil von insgesamt 1 % zugeführt. Nach einer weiteren Stunde Inkubation im Brutschrank, wurde ein Teil der Zellen für 60 min mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 505 \text{ nm}$) belichtet. 24 h nach der Zugabe des Komplexes wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden sie mit Trypsin von Plattenboden gelöst. Die erhaltene Zellsuspension sowie das abgenommene Medium und der Puffer des Waschgangs wurden in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen vereint und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 μL einer hypotonen PI-Lösung, bestehend aus 50 $\mu\text{g/mL}$ PI, 0.1 % Natriumcitrat und 0.1 % Triton X-100 in destilliertem Wasser, gelöst. Durch den hypotonen Charakter der Lösung und das zusätzliche Triton X-100 wurden die Plasmamembranen der Zellen durchlässig und nur die Zellkerne blieben für die anschließende Bestimmung des DNA-Gehalts bestehen. Die auf diese Weise fertiggestellten Proben wurden für 1 h auf Eis inkubiert und anschließend mit einem

Durchflusszytometer analysiert. Die dabei gemessene Fluoreszenz der einzelnen Zellen wurde anschließend anhand von Referenzwerten den verschiedenen Zellzyklusphasen zugeordnet.

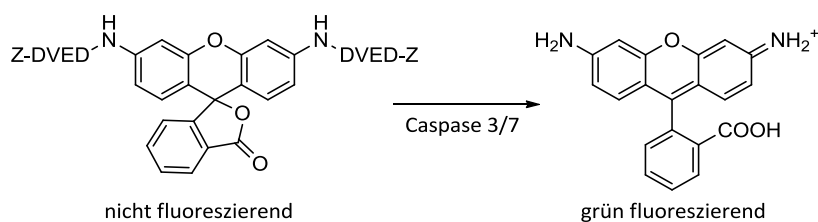
5.2.8 Nachweis der Caspase-Aktivität

Caspasen sind ein wichtiger Bestandteil der Einleitung und Ausführung der Apoptose und gehören entsprechend ihrer proteolytischen Aktivität zur Enzymgruppe der Proteasen. Allgemeine charakteristische Merkmale der Caspasen sind ein Cysteinrest im aktiven Zentrum sowie das Vorhandensein eines Aspartats innerhalb der Erkennungssequenz ihres Substrats.^[146] Beiden Eigenschaften verdankt das Enzym die Bezeichnung *Cysteiny*l *aspartate-specific prote*inase, wovon sich der heute gebräuchliche Name Caspase ableitet. Insgesamt umfasst die Caspase-Familie mehr als zehn bekannte Mitglieder, deren jeweilige Funktion in der Ereigniskette der Apoptose mehr oder weniger gut beschrieben ist. Jede Caspase erkennt ihr Substrat anhand einer vier Aminosäuren langen Peptidsequenz, die ihr die Spaltung ausgewählter Zielproteine ermöglicht. Auf diese Weise erhält jede Caspase eine eigene Funktion während des Ablaufs des programmierten Zelltods.

Der Nachweis aktiver Caspasen ist ein eindeutiger Beweis für das Stattfinden der Apoptose und wird daher häufig bei der Untersuchung zytotoxischer Verbindungen eingesetzt. Ein einfacher und effektiver Weg zur Umsetzung dieses Vorhabens, ist die Kopplung eines geeigneten Nachweismoleküls mit der Substratsequenz einer bestimmten Caspase. Auf diese Weise entsteht ein zunächst inaktiver Nachweisstoff, der von der entsprechenden Caspase gespalten und aktiviert werden kann. Zwei der gängigen Methoden, die auf diesem Prinzip basieren, wurden in dieser Arbeit angewendet und werden im Folgenden näher erläutert.

5.2.8.1 Apo-ONE Homogeneous Caspase Assay

Für den Nachweis der Aktivität der Caspasen 3 und 7 wurde der hierfür entwickelte Test Apo-ONE von Promega eingesetzt. Dieser basiert auf einer speziell abgewandelten Variante des Farbstoffs Rhodamin 110, bei der die fluoreszierende Eigenschaft des Moleküls zunächst durch die Kopplung an das Tetrapeptid DEVD gequencht wird (Schema 7). DEVD ist die Substratsequenz der Caspasen 3 und 7 und sollte demnach auch nur in deren Anwesenheit vom Nachweisreagens abgespalten werden. Das dabei entstehende Fluoreszenzsignal ist proportional zur Aktivität der untersuchten Caspasen.



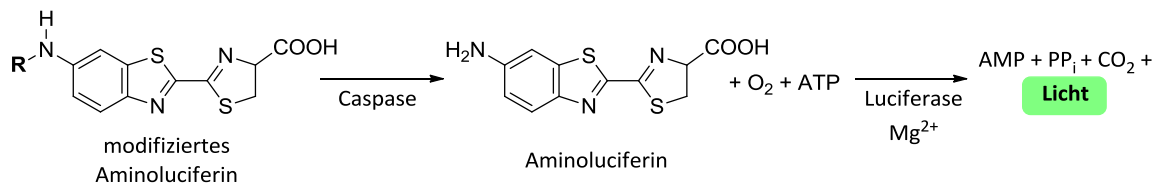
Schema 7: Auf dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 110 basierender Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Nachweis von Promega.

Für den Versuch wurden HeLa-Zellen in einer Zahl von 18,000 Zellen/*well* in einer schwarzen 96-*well* Mikrotiterplatte ausgesät. Nach einer Inkubation von 24 h wurde das Medium entfernt und durch 100 μL einer Verdünnung des Komplexes SEK030 (1 μM) in Medium mit 1 % DMSO ersetzt. Diese wurde für 1 h mit den Zellen im Brutschrank inkubiert und anschließend mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 505 \text{ nm}$) für 30 min belichtet. Danach wurden die Zellen erneut für 5 h im Brutschrank inkubiert, bevor sie mit zusätzlichen 100 μL des Nachweisreagens Z-DEVD-R110 behandelt wurden. Dieses wurde zuvor nach den Angaben des Herstellers 1:100 mit einem speziellen Puffer der Firma Promega verdünnt, dessen Funktion in der Lyse der Zellen sowie der Erhaltung der Caspase-Aktivität besteht. Nach einer Inkubation von 60 min bei Raumtemperatur und 350 rpm, wurde das Fluoreszenzsignal der Proben mit einem *Microplate Reader* gemessen (Ex 485 nm / Em 538 nm). Als Positivkontrolle wurde zusätzlich die Aktivität der Caspasen nach einer 5-stündigen Inkubation des Kinaseinhibitors Staurosporin bei einer Konzentration von 1 μM gemessen. Als Negativkontrolle diente, wie üblich, die Inkubation der Zellen in Medium versetzt mit 1 % DMSO.

5.2.8.2 Caspase-Glo Assay

Das Caspase-Glo Verfahren ist eine von der Firma Promega entwickelte, Lumineszenz-basierte Nachweismethode zur Bestimmung der Aktivität verschiedener Caspasen. Anders als bei dem zuvor beschriebenen Fluoreszenz-basierten Nachweis, wird hier das Substrat der Luciferase mit einem Caspase-spezifischen Tetrapeptid versehen (Schema 8). Das auf diese Weise modifizierte Aminoluciferin reagiert, nach seiner Spaltung durch die entsprechende Caspase, mit Sauerstoff und ATP zu einem angeregten Oxyluciferin. Im Zuge seiner Rückkehr in den Grundzustand entsendet dieses ein Photon, das als Lumineszenzsignal gemessen werden kann. Der entscheidende Katalysator dieser Reaktion ist die Luciferase, die ebenfalls im Reaktionsgemisch enthalten ist. Ein Vorteil dieser Methode im Vergleich zum Fluoreszenz-basierten Nachweis ist ihre deutlich höhere Sensitivität und das Fehlen möglicher Hintergrundstrahlung durch angeregte Moleküle im Reaktionsgemisch.

Caspase 8 Nachweis: **R** = Z-LETD
 Caspase 3/7 Nachweis: **R** = Z-DEVD



Schema 8: Funktionsweise des Lumineszenz-basierten Caspase-Glo Nachweises von Promega.

In dieser Arbeit wurde sowohl die Aktivität der Caspase 8, als auch die zeitabhängige Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit der Caspase-Glo Methode gemessen. Das Substrat im Caspase 8 Nachweis war dabei mit dem Tetrapeptid LETD versehen, während das für die Caspasen 3 und 7 erneut die Sequenz DEVD trug.

Für die Versuche wurden HeLa-Zellen in einer Zahl von 20,000 Zellen/*well* auf einer weißen 96-*well* Mikrotiterplatte ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium aus den *wells* abgenommen und durch 100 µL einer Verdünnung des Komplexes SEK030 in Medium ersetzt (1 µM SEK030, 1 % DMSO). Zellen der Negativkontrolle wurden lediglich mit 1 % DMSO behandelt. Es folgte eine Inkubation von einer Stunde im Brutschrank und die anschließende Belichtung eines Teils der Zellen mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 505$ nm) für 30 min. Danach wurden die Zellen, je nach Fragestellung des Versuchs, für eine gewisse Zeit zuerst im Brutschrank und die letzte halbe Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Für die Durchführung des Nachweises wurde jedes *well* mit zusätzlichen 100 µL des fertig von Promega gelieferten Caspase-Glo Reagents versehen. Hierin enthalten waren sowohl das entsprechend modifizierte Aminoluciferin und die Luciferase selbst, sowie sämtliche Pufferbestandteile für eine optimale Caspase-Aktivität und die Lyse der Zellen. Für den Nachweis der Caspase 8 Aktivität wurde das Gemisch zusätzlich mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 versehen, um störende Hintergrundsignale zu vermeiden. Anschließend wurden die Proben für 3 min bei Raumtemperatur und 400 rpm inkubiert, bevor sie mit einem *Microplate Reader* ausgewertet wurden. Für den Nachweis der Caspase 8 Aktivität wurde eine Positivkontrolle mit 2 µg/mL TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) durchgeführt, welches ein bekannter Aktivator des extrinsischen Apoptosewegs ist.

5.2.9 Messung von Veränderungen im mitochondrialen Membranpotential

Das mitochondriale Membranpotential basiert auf einem von der Atmungskette aufrechterhaltenen Protonengradienten über der inneren Membran und dient als Energielieferant für die ATP-Synthase. Eine Veränderung des Potentials tritt hauptsächlich im Zusammenhang mit einer

erhöhten Protonenleitfähigkeit der inneren Membran auf und führt zur Entkopplung der Atmungskette. Ein kompletter Verlust des Gradienten hat zur Folge, dass ein wichtiger Teil der Energieversorgung der Zelle verloren geht. Dieser fatale Schritt tritt jedoch normalerweise nur im Falle des Zelltods ein, wenn die Mitochondrienmembran zerstört oder, durch die dauerhafte Öffnung von Kanälen, durchlässig für H^+ -Ionen wird. Der Verlust von $\Delta\Psi_m$ ist ein Merkmal der Apoptose und wurde als solches in dieser Arbeit untersucht. Als Nachweisreagens diente hierbei 3,3'-Dihexyloxacarbocyanin (DiOC6). Dieser lipophile, kationische Farbstoff lagert sich in einer $\Delta\Psi_m$ -abhängigen Weise in den Mitochondrien an und erzeugt dort ein starkes Fluoreszenzsignal. Ein Verlust des Membranpotentials geht daher mit einem gleichzeitigen Verlust der Fluoreszenzintensität einher.

Für den Versuch wurden HeLa-Zellen in einer Zahl von 500,000 Zellen/*well* in einer 6-*well* Mikrotiterplatte ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach dem Anwachsen wurde das Medium abgenommen und durch 3 mL einer 1 μ M Verdünnung von SEK030 in frischem Medium ersetzt. Die Lösung enthielt eine Gesamtkonzentration von 1 % DMSO. Als Kontrolle dienten Zellen, die lediglich mit 1 % DMSO haltigem Medium behandelt wurden. Die jeweiligen Verdünnungen wurden für 1 h mit den Zellen im Dunkeln inkubiert und ein Teil von ihnen danach für 1 h mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 505$ nm) belichtet. Nach einer anschließenden Inkubation von 3 oder 5 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dieser Schritt diente als Vorbereitung für die folgende Ablösung der Zellen vom Plattenboden mit 1 mL Trypsin. Die gelösten Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen mit 2 mL Medium überführt und der Zellgehalt der Suspension mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die restlichen Zellen wurden abzentrifugiert und in 200 μ L DiOC6-Lösung (20 nM in PBS) pro 100,000 Zellen aufgenommen. Die so erhaltenen Proben wurden für 20 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Auswertung erfolgte mit einem Durchflusszytometer der Arbeitsgruppe OCKER von Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg.

5.2.10 3D-Angiogenese Test

Für den Nachweis einer *in vitro* antiangiogenen Wirkung des Komplexes AW0234 wurde das Verhalten entsprechend behandelter Kapillaren-bildender Endothelzell-Sphäroide untersucht. Die hierfür benötigten HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) wurden von der Firma PromoCell als bereits kultivierte Sphäroide in einer Kollagen-Matrix bezogen. Im Gegensatz zu den permanenten Krebszelllinien, können solche primären Zellen nicht dauerhaft kultiviert werden und müssen daher stets aus frischem Gewebe nachgezogen werden. Dies macht ihre

Anwendung deutlich komplizierter, bietet jedoch den Vorteil, dass mehr der natürlichen Eigenschaften der Zellen erhalten bleiben. Die in dieser Arbeit eingesetzten Sphäroide wurden in einer 24-*well* Platte geliefert, die zu etwa 0.5 cm mit der Kollagen-Matrix gefüllt war. Darin eingebettet befanden sich zahlreiche Aggregate bestehend aus je 400-500 Zellen. Direkt nach ihrer Ankunft wurde die Platte für 30 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Transportmedium aus den einzelnen *wells* entfernt und durch 200 µL in Medium verdünntem AW0234 ersetzt. Ebenfalls in dieser Lösung enthalten waren DMSO sowie der Wachstumsfaktor VEGF (jeweilige Endkonzentration: DMSO 1 %; VEGF 25 ng/mL). Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 25 ng/mL VEGF und 1 % DMSO behandelt. Die Negativkontrolle enthielt lediglich 1 % DMSO. Die behandelten Sphäroide wurden für 48 h im Brutschrank inkubiert und danach mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Axiovert 200 M von Zeiss) ausgewertet. Hierzu wurden einzelne Sphäroide abfotografiert und anschließend die gewachsenen Sprosse vermessen. Danach wurde für jedes Sphäroid die Länge der einzelnen Sprosse zur kumulativen Sprosslänge addiert. Dieser Wert wurde über mindestens zehn Sphäroide gemittelt und als aussagekräftige Größe für antiangiogene Wirkung von AW0234 herangezogen. Um eine Kinasen-unabhängige Wirkung des Inhibitors auf das Sprosswachstum auszuschließen, wurde als zusätzliche Kontrolle eine *N*-methylierte Variante des Komplexes untersucht, die nachweislich keinen hemmenden Effekt auf die VEGF-Rezeptoren hat.^[156]

5.2.11 Bestimmung der IC₅₀-Werte

Die Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration des Komplexes SEK030 für die Proteinkinase Pim1 wurde mit Hilfe einer auf radioaktivem [γ -³³P]ATP basierenden Methode durchgeführt. Hierzu wurde ein Reaktionsgemisch aus 150 µL H₂O, 100 µL Reaktionspuffer (40 mM MOPS/NaOH; 50 mM MgOAc; pH 7) und 50 µL Substrat (500 µM) erstellt und mit 100 µL Kinase (16 nM in 20 mM MOPS/NaOH; 1 mM EDTA; 0.01 % Brij35; 5 % Glycerin; 0.1 % 2-Mercaptoethanol; 1 mg/mL BSA; pH 7) versetzt. Je 17.5 µL dieses Ansatzes wurden in die *wells* einer 96-*well* Mikrotiterplatte pipettiert und mit 2.5 µL des entsprechend in DMSO/H₂O (1:1) verdünnten Komplexes versetzt. Die Ansätze wurden gut gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln oder unter Belichtung mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 450$ nm) inkubiert. Diese Phase diente der Anlagerung des Inhibitors im aktiven Zentrum der Kinase. Nach Ablauf der Zeit wurden den Reaktionslösungen 5 µL einer ATP-Lösung (500 µM in H₂O, versetzt mit 0.4 µCi [γ -³³P]ATP) zugegeben. Es folgte eine erneute Inkubation für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit wurde das ATP von den nicht inhibierten Kinasen umgesetzt und einer seiner Phosphatreste auf das Substrat übertragen. 14 µL des Reaktions-

gemischs wurden anschließend auf ein *Whatman*-Filterpapier pipettiert und für 5 min getrocknet. Danach wurden die Filterpapiere 4× mit 0.75 % Phosphorsäure und 1× mit Aceton gewaschen. Während diesem Schritt wurden alle Bestandteile des Reaktionsgemischs entfernt, mit Ausnahme des Substrats, welches unter sauren Bedingungen eine Wechselwirkung mit den Diethylaminoethyl-Gruppen des Filterpapiers eingeht. Das getrocknete Papier wurde anschließend in ein Szintillation Gefäß mit 5 mL Szintillationsflüssigkeit überführt und die dabei entstehenden Lichtblitze mit einem Szintillationsdetektor gezählt. Für die Auswertung wurde zunächst die Hintergrundstrahlung von den gemessenen Werten subtrahiert und anschließend die Restaktivität der Kinase nach der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen SEK030 bestimmt. Als Referenz diente hierbei eine unbehandelte Probe, deren Aktivität mit 100 % gleichgesetzt wurde. Für die erhaltenen Datenpunkte wurde mit der Origin-Software eine Ausgleichsrechnung durchgeführt, mit deren Hilfe der IC_{50} -Wert bestimmt wurde.

5.2.12 Nicht selbstständig durchgeführte Arbeiten

5.2.12.1 3D-Zellkultur

Die in dieser Arbeit gezeigten 3D-Kulturexperimente mit den Melanom-Zelllinien WM3918 und 1205Lu wurden am *Wistar Institute* in Philadelphia in der Arbeitsgruppe von MEENHARD HERLYN von ADINA VULTUR und BATOOL SHANNAN durchgeführt. Beide Zelllinien wurden in DMEM mit 5 % FBS kultiviert. Für die Präparation der Sphäroide wurden 200 μ L Zellsuspension (25,000 Zellen/mL) in einer 96-well Mikrotiterplatte ausgekleidet mit 1.5 % Agar ausgesät und für 72 h inkubiert. Die während dieser Zeit entstandenen Sphäroide wurden mit einer 1000 μ L Pipette entnommen und in ein Gel aus Rinderkollagen Typ I überführt. Dieses wurde zuvor in einer Lösung aus DMEM, L-Glutamin und 2 % FBS angesetzt. Das feste Gel wurde abschließend mit einer Schicht aus normalem 2 %igem Zellmedium überzogen. Die auf diese Weise präparierten Sphäroide wurden mit 1 bzw. 20 μ M SEK030 behandelt. Die belichtete Kontrolle enthielt lediglich 1 % DMSO. Nach einer Inkubation von 1 h wurde ein Teil der Sphäroide mit einem LED-Reflektor belichtet (Abstand zu den Zellen 23.5 cm). 24 h nach der Belichtung wurden die Zellaggregate mit einem *LIVE/DEAD Viability Assay* von Invitrogen angefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon TE2000) ausgewertet.

5.2.12.2 Nachweis von Singulett Sauerstoff

Sämtliche extrazellulären Nachweisreaktionen von $^1\text{O}_2$ wurden von KATHRIN WÄHLER im Zuge ihrer Doktorarbeit durchgeführt.^[139] Die hierbei eingesetzte Methode basiert auf den Arbeiten von KRALIĆ und EL MOHSNI^[138] und verwendet den redoxsensitiven Farbstoff *p*-Nitrosodimethylanilin (RNO). Da RNO nicht dazu in der Lage ist, selbst mit dem kurzlebigen $^1\text{O}_2$ zu reagieren, enthält das Reaktionsgemisch zusätzlich eine gewisse Konzentration an Imidazol. Dieses reagiert mit $^1\text{O}_2$ durch Cycloaddition zu hochreaktiven Endoperoxiden mit einem deutlich größeren Redoxpotential und einer gesteigerten Halbwertszeit. In einer Folgereaktion oxidieren dann die entstandenen Imidazolendoperoxide die Nitrosogruppe des RNOs und verursachen dadurch dessen Entfärbung. Für den Versuch wurden zunächst Stocklösungen der Komponenten RNO (500 μ M) (Alfa Aesar) und Imidazol (80 mM) (Sigma) in PBS angesetzt. Die zu untersuchenden Komplexe wurden als 1 mM Stocklösungen in DMSO präpariert. 10 μ L RNO, 10 μ L Imidazol und 5 μ L Komplex wurden anschließend zu 75 μ L PBS/DMSO (1:1.5) in die wells einer 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Die fertigen Ansätze wurden für 30 min belichtet bzw. als Dunkelkontrolle bei Raumtemperatur inkubiert. Jeweils vor und nach der Belichtung wurde die Absorption der Lösungen bei 440 nm gemessen und die negative Differenz aus beiden Werten gebildet. Der daraus erhaltene Wert gibt die relative $^1\text{O}_2$ -Produktion in der Lösung an.

5.2.12.3 Bestimmung der Absorptionsspektren

Die in dieser Arbeit gezeigten Absorptionsspektren wurden von SANDRA DIECKMANN und KATHRIN WÄHLER angefertigt. Sie wurden bei einer Komplexkonzentration von 60 μM in DMSO mit einem DU800 Spektrophotometer (Beckman Coulter) aufgenommen.

5.2.12.4 Lokalisation

Für die Lokalisationsexperimente wurde der Pyridin-Ligand des Rhenium-Komplexes SEK030 von KATHRIN WÄHLER modifiziert und über einen Linker mit einem Biotinmolekül gekoppelt (Abbildung 49).^[139] Der hierbei entstandene Komplex wurde anschließend mit Hilfe eines gegen das Biotin gerichteten Antikörpers in den Zellen detektiert. Die hierzu notwendigen zellulären Arbeiten wurden von RAIMO HARTMANN aus der Arbeitsgruppe PARAK am Fachbereich Physik der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

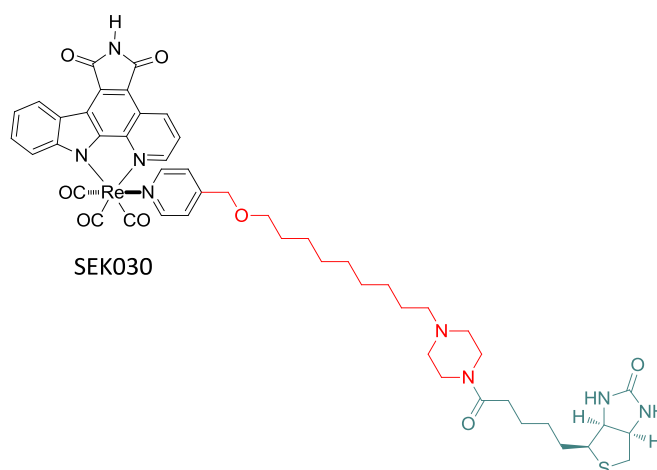


Abbildung 49: Biotinylierte Variante des Komplexes SEK030 zur Lokalisation in HeLa-Zellen. **Rot:** Linker; **Blau:** Biotin.

Für die Experimente wurden HeLa-Zellen in einer Dichte von 15,000 Zellen/ cm^2 auf einem 12 mm Deckglas ausgesät. Nach dem Anwachsen wurde das alte Medium abgenommen und durch eine 1 μM Verdünnung des Komplexes ersetzt. Die Biotin-markierte Verbindung wurde für 24 h mit den Zellen inkubiert, bevor diese für 15 min in einer 4 %igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert wurden. Für die anschließende Immunfärbung wurden die Zellen zunächst mit einer Lösung aus 5 mg/mL Glycin und 0.5 mg/mL Saponinen in PBS permeabilisiert (5 min) und im direkten Anschluss mit 20 mg/mL BSA in der gleichen Lösung geblockt, um unspezifische Bindestellen des Antikörpers abzudecken. Der monoklonale anti-Biotin Antikörper aus der Maus (Santa Cruz Biotechnology, sc-57636) wurde 1:200 in *Blocking*-Lösung verdünnt und für 1 h bei 37 °C mit den Zellen inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein DyLight 649-markierter anti-Maus Antikörper (Jackson ImmunoResearch) mit einer Konzentration von 1.25 $\mu\text{g/mL}$ eingesetzt.

und für ebenfalls 1 h inkubiert. Die Auswertung der Färbung erfolgte mit einem Laser Scanning Mikroskop des Typs Axiovert 200 M von Carl Zeiss (Scanning Modul: LSM 510 META).

Für zusätzliche Co-Lokalisationsexperimente wurden des Weiteren der Zellkern, die Plasmamembran, die Mitochondrien sowie die Endo- und Lysosomen angefärbt. Letztere wurden mit dem RFP-markierten *early endosomal antigen 1* (EEA1) und dem GFP-markierten *lysosomal associated protein 1* (LAMP1) sichtbar gemacht. Hierzu wurden die Zellen bereits 12 h nach dem Aussäen mit 6 µL CellLight Endosomes-RFP BacMam 2.0 und 6 µL CellLight Lysosomes-GFP BacMam 2.0 (Life Technologies) behandelt. Beide Reagenzien enthalten modifizierte Viruspartikel eines Insektenvirus, dessen Gene zum Teil durch einen Säugetierpromotor reguliert werden. Dies führt dazu, dass bei einer Infektion menschlicher Zellen lediglich die gewünschten Proteine gebildet werden, in diesem Fall rot fluoreszierendes EEA1 und grün fluoreszierendes LAMP1. Die zugegebene Menge der beiden Reagenzien entspricht etwa je 20 Viruspartikeln pro Zelle. Für die Visualisierung der Mitochondrien wurde das gleiche Verfahren mit der GFP-markierten E1-alpha Pyruvatdehydrogenase angewendet. Auch hier wurden 12 h nach dem Aussäen Viruspartikel in Form des CellLight Mitochondria-GFP BacMam 2.0 Reagens in einer Konzentration von 20 Partikel/Zelle mit den HeLa-Zellen inkubiert. Im Gegensatz dazu wurde die Plasmamembran erst nach der Fixierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff WGA-TMR (20 µg/mL in HBSS) angefärbt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte klassisch mit DAPI im Anschluss an die Inkubation der Antikörper.

5.2.12.5 KINOMEscan

Für die Durchführung eines Screenings der Verbindung SEK030, gegen eine Sammlung aus über 450 mutierten und nicht-mutierten Kinasen, wurde die Firma DiscoverRx beauftragt. Diese testet potentielle Kinaseinhibitoren nach der speziell hierfür entwickelten KINOMEscan Methode. Hierbei werden auf einer Festphase immobilisierte Liganden gemeinsam mit einer bestimmten Kinase und dem potentiellen Inhibitor inkubiert (Abbildung 50). Eine Verbindung mit einer hohen Affinität zum aktiven Zentrum der Kinase verhindert die Bindung des Enzyms an seinen eigentlichen Liganden, so dass dieses bei der anschließenden Isolierung der Festphase mit der Waschlösung verloren geht. Die tatsächlich am Liganden gebundene Menge der Kinase wird mit Hilfe einer ultra-sensitiven qPCR bestimmt, welche einen speziell an der Kinase angebrachten DNA-Marker amplifiziert. Als Maß für die Affinität des Inhibitors zur Kinase wird die Menge an isolierter Kinase, verglichen mit einer Kontrollprobe ohne Inhibitor, in Prozent angegeben. Die Bindung des Inhibitors im aktiven Zentrum ist daher umso stärker, je geringer der gemessene Wert für eine bestimmte Kinase ist.

Für die Durchführung des *Scans* wurden, mit der DNA einer bestimmten Kinase versehene, T7 Phagen in einem *E.coli* Wirt des Stamms BL21 vermehrt. Beim Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wurden die Bakterien infiziert und bis zu ihrer Lyse nach etwa 90-150 min schüttelnd bei 32 °C inkubiert. Die erhaltenen Lysate wurden zentrifugiert (6000 × g) und anschließend filtriert (0.2 µm). Die eigentliche Produktion der Kinase fand in HEK-293 Zellen statt. Für die spätere Quantifizierung mit Hilfe der qPCR wurden die einzelnen Kinasemoleküle mit einem DNA-Tag versehen. Als weitere Vorbereitung wurden Streptavidin-tragende, magnetische Kugeln mit dem biotinylierten Liganden für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die auf diese Weise immobilisierten Liganden wurden anschließend mit einem Überschuss an Biotin geblockt und mit einem speziellen Puffer (SeaBlock (Pierce), 1 % BSA, 0.05 % Tween 20, 6 mM DTT) gewaschen, um ungebundene Moleküle zu entfernen. Für den eigentlichen Versuch wurden die präparierte Kinase, die immobilisierten Liganden sowie die Testverbindung in einem Puffer aus 20 % SeaBlock, 0.17× PBS, 0.05 % Tween 20 und 6 mM DTT zusammengegeben. Die Testverbindung wurde zuvor als 40-fache Stocklösung in DMSO angesetzt und als solche direkt zum Reaktionsgemisch gegeben. Die Durchführung des Versuchs erfolgte in 384-well Mikrotiterplatten in einem Gesamtvolumen von 0.04 mL. Während der Reaktionszeit von 1 h wurden die Platten schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Liganden-besetzten, magnetischen Kugeln mit Puffer (1× PBS, 0.05 % Tween 20) gewaschen und anschließend in einem Elutionspuffer (1× PBS, 0.05 % Tween 20, 0.5 µM nicht-biotinylierter Ligand) resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurde die Kinasekonzentration des Eluats mit Hilfe einer qPCR (*Real-time quantitative PCR*) bestimmt.

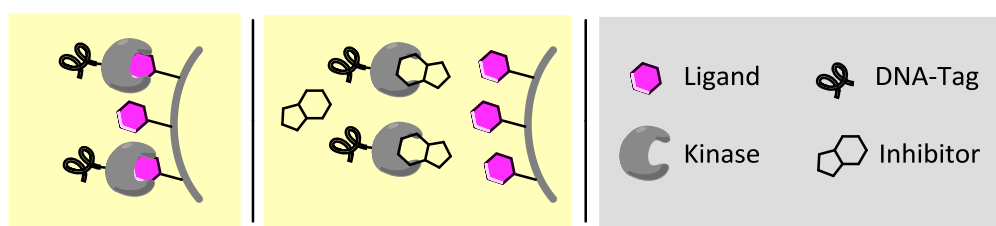


Abbildung 50: Darstellung des Prinzips eines KINOMEscans.

Literaturverzeichnis

- [1] E. B. Krumbhaar, H. D. Krumbhaar, *J. Med. Res.* **1919**, 40, 497-508.3.
- [2] V. T. DeVita, E. Chu, *Cancer Res.* **2008**, 68, 8643-8653.
- [3] A. Gilman, F. S. Philips, *Science* **1946**, 103, 409-415.
- [4] A. Gilman, *Am. J. Surg.* **1963**, 105, 574-578.
- [5] R. J. Goldacre, A. Lvoeless, W. C. J. Ross, *Nature* **1949**, 163, 667-669.
- [6] K. W. Kohn, C. L. Spears, P. Doty, *J. Mol. Biol.* **1966**, 19, 266-288.
- [7] V. N. Iyer, W. Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1963**, 50, 355-362.
- [8] J. J. Roberts, J. M. Pascoe, *Nature* **1972**, 235, 282-284.
- [9] S. Farber, L. K. Diamond, R. D. Mercer, R. F. Sylvester, J. A. Wolff, *N. Engl. J. Med.* **1948**, 238, 787-793.
- [10] M. J. Osborn, M. Freeman, F. M. Huennekens, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1958**, 97, 429-431.
- [11] G. H. Hitchings, G. B. Elion, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1954**, 60, 195-199.
- [12] H. E. Skipper, J. R. Thomson, G. B. Elion, G. H. Hitchings, *Cancer Res.* **1954**, 14, 294-298.
- [13] J. Furth, M. C. Kahn, C. Breedis, *Am. J. Cancer* **1937**, 31, 276-282.
- [14] V. DeVita, A. Serpick, P. Carbone, *Ann. Intern. Med.* **1970**, 73, 881-895.
- [15] W. P. McGuire, *Ann. Intern. Med.* **1989**, 111, 273-279.
- [16] B. A. Chabner, T. G. Roberts, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5, 65-72.
- [17] F. Sanger, A. R. Coulson, *J. Mol. Biol.* **1975**, 94, 441-448.
- [18] P. Rous, *Conn. Med.* **1973**, 37, 526.
- [19] D. Stehelin, R. V Guntaka, H. E. Varmus, J. M. Bishop, *J. Mol. Biol.* **1976**, 101, 349-365.
- [20] D. Stehelin, H. E. Varmus, J. M. Bishop, P. K. Vogt, *Nature* **1976**, 260, 170-173.
- [21] D. H. Spector, H. E. Varmus, J. M. Bishop, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, 75, 4102-4106.
- [22] J. S. Brugge, R. L. Erikson, *Nature* **1977**, 269, 346-348.

- [23] A. D. Levinson, H. Oppermann, L. Levintow, H. E. Varmus, J. M. Bishop, *Cell* **1978**, *15*, 561-572.
- [24] T. Hunter, B. M. Sefton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77*, 1311-1315.
- [25] C. Shih, B. Z. Shilo, M. P. Goldfarb, A. Dannenberg, R. A. Weinberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76*, 5714-5718.
- [26] R. S. Herbst, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2004**, *59*, 21-26.
- [27] H. Davies, G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, et al., *Nature* **2002**, *417*, 949-954.
- [28] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
- [29] B. S. Taylor, J. Barretina, R. G. Maki, C. R. Antonescu, S. Singer, M. Ladanyi, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 541-557.
- [30] N. Heisterkamp, J. R. Stephenson, J. Groffen, P. F. Hansen, A. de Klein, C. R. Bartram, G. Grosveld, *Nature* **1983**, *306*, 239-242.
- [31] A. Arora, E. M. Scholar, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 971-979.
- [32] B. J. Druker, S. Tamura, E. Buchdunger, S. Ohno, G. M. Segal, S. Fanning, J. Zimmermann, N. B. Lydon, *Nat. Med.* **1996**, *2*, 561-566.
- [33] V. Rusch, J. Baselga, C. Cordon-Cardo, J. Orazem, M. Zaman, S. Hoda, J. McIntosh, J. Kurie, E. Dmitrovsky, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 2379-2385.
- [34] M. Fukuoka, S. Yano, G. Giaccone, T. Tamura, K. Nakagawa, J.-Y. Douillard, Y. Nishiwaki, J. Vansteenkiste, S. Kudoh, D. Rischin, et al., *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 2237-2246.
- [35] J. G. Paez, P. A. Jänne, J. C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F. J. Kaye, N. Lindeman, T. J. Boggon, et al., *Science* **2004**, *304*, 1497-1500.
- [36] M. E. Gorre, M. Mohammed, K. Ellwood, N. Hsu, R. Paquette, P. N. Rao, C. L. Sawyers, *Science* **2001**, *293*, 876-880.
- [37] N. Steeghs, J. W. R. Nortier, H. Gelderblom, *Ann. Surg. Oncol.* **2007**, *14*, 942-953.
- [38] T. Minko, J. Khandare, *Fundam. Biomed. Technol.* **2008**, *4*, 309-336.
- [39] E. Mrózek, C. A. Rhoades, J. Allen, E. M. Hade, C. L. Shapiro, *Ann. Oncol.* **2005**, *16*, 1087-1093.
- [40] D. A. Thomas, A. H. Sarris, J. Cortes, S. Faderl, S. O'Brien, F. J. Giles, G. Garcia-Manero, M. A. Rodriguez, F. Cabanillas, H. Kantarjian, *Cancer* **2006**, *106*, 120-127.
- [41] O. Raab, *Z. Biol.* **1900**, *39*, 524-546.
- [42] D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 380-387.

- [43] J. Moan, Q. Peng, *Photodynamic Therapy*, Royal Society Of Chemistry, Cambridge, **2003**.
- [44] K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, T. Kiesslich, *Lasers Med. Sci.* **2009**, *24*, 259-268.
- [45] K. R. Weishaupt, C. J. Gomer, T. J. Dougherty, *Cancer Res.* **1976**, *36*, 2326-2329.
- [46] K. Szaciłowski, W. Macyk, A. Drzewiecka-Matuszek, M. Brindell, G. Stochel, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2647-2694.
- [47] M. DeRosa, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *233-234*, 351-371.
- [48] M. Ochsner, *J. Photochem. Photobiol. B.* **1997**, *39*, 1-18.
- [49] J. Moan, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1990**, *6*, 343-344.
- [50] M. Ethirajan, Y. Chen, P. Joshi, R. K. Pandey, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 340-362.
- [51] L. B. Josefsen, R. W. Boyle, *Met. Based. Drugs* **2008**, *2008*, 276109.
- [52] P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, et al., *CA. Cancer J. Clin.* **2012**, *61*, 250-281.
- [53] E. D. Sternberg, D. Dolphin, C. Brickner, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4151-4202.
- [54] D. Kessel, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 1703-1706.
- [55] J. Moan, S. Sommer, *Cancer Lett.* **1983**, *21*, 167-174.
- [56] J. F. Evensen, S. Sommer, J. Moan, T. Christensen, *Cancer Res.* **1984**, *44*, 482-486.
- [57] J. F. Kelly, M. E. Snell, *J. Urol.* **1976**, *115*, 150-151.
- [58] T. J. Dougherty, *J. Clin. Laser Med. Surg.* **1996**, *14*, 219-221.
- [59] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, **2007**.
- [60] S. Sassa, S. Schwartz, G. Ruth, *J. Exp. Med.* **1981**, *153*, 1094-1101.
- [61] B. Krammer, K. Plaetzer, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 283-289.
- [62] A. Zimmermann, M. Ritsch-Marte, H. Kostron, *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 611-616.
- [63] A. K. D'Cruz, M. H. Robinson, M. A. Biel, *Head Neck* **2004**, *26*, 232-240.
- [64] C. Hopper, A. Kübler, H. Lewis, I. B. Tan, G. Putnam, *Int. J. Cancer* **2004**, *111*, 138-146.
- [65] J. Trachtenberg, A. Bogaards, R. A. Weersink, M. A. Haider, A. Evans, S. A. McCluskey, A. Scherz, M. R. Gertner, C. Yue, S. Appu, et al., *J. Urol.* **2007**, *178*, 1974-1979.

- [66] A. E. O'Connor, W. M. Gallagher, A. T. Byrne, *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 1053-1074.
- [67] M. J. Hammer-Wilson, M. Ghahramanlou, M. W. Berns, *Lasers Surg. Med.* **1999**, *24*, 276-284.
- [68] E. Vogel, M. Köcher, H. Schmickler, J. Lex, *Angew. Chemie* **1986**, *98*, 262-264.
- [69] M. R. Detty, S. L. Gibson, S. J. Wagner, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3897-3915.
- [70] J. D. Miller, E. D. Baron, H. Scull, A. Hsia, J. C. Berlin, T. McCormick, V. Colussi, M. E. Kenney, K. D. Cooper, N. L. Oleinick, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *224*, 290-299.
- [71] N. Sekkat, H. van den Bergh, T. Nyokong, N. Lange, *Molecules* **2012**, *17*, 98-144.
- [72] K. Orth, D. Russ, G. Beck, A. Rück, H. G. Beger, *Langenbecks. Arch. Surg.* **1998**, *383*, 276-281.
- [73] K. Orth, A. Rück, A. Stanescu, H. G. Beger, *Lancet* **1995**, *345*, 519-520.
- [74] K. J. Mellish, R. D. Cox, D. I. Vernon, J. Griffiths, S. B. Brown, *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 392-397.
- [75] F. I. McNair, B. Marples, C. M. West, J. V. Moore, *Br. J. Cancer* **1997**, *75*, 1721-1729.
- [76] J. Y. Chen, N. K. Mak, J. M. Wen, W. N. Leung, S. C. Chen, M. C. Fung, N. H. Cheung, *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 545-554.
- [77] Y. S. Bae, H. Oh, S. G. Rhee, Y. Do Yoo, *Mol. Cells* **2011**, *32*, 491-509.
- [78] J. Chandra, A. Samali, S. Orrenius, *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 323-333.
- [79] P. Cejas, E. Casado, C. Belda-Iniesta, J. De Castro, E. Espinosa, A. Redondo, M. Sereno, M. A. García-Cabezas, J. A. F. Vara, A. Domínguez-Cáceres, et al., *Cancer Causes Control* **2004**, *15*, 707-719.
- [80] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *160*, 1-40.
- [81] A. C. E. Moor, *J. Photochem. Photobiol. B.* **2000**, *57*, 1-13.
- [82] N. L. Oleinick, R. L. Morris, I. Belichenko, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 1-21.
- [83] D. Kessel, Y. Luo, Y. Deng, C. K. Chang, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 422-426.
- [84] D. Kessel, Y. Luo, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1998**, *42*, 89-95.
- [85] D. Kessel, Y. Luo, *Cell Death Differ.* **1999**, *6*, 28-35.
- [86] M. E. Varnes, S. M. Chiu, L. Y. Xue, N. L. Oleinick, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *255*, 673-679.

- [87] D. J. Granville, C. M. Carthy, H. Jiang, G. C. Shore, B. M. McManus, D. W. Hunt, *FEBS Lett.* **1998**, *437*, 5-10.
- [88] S. Desagher, J. C. Martinou, *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*, 369-377.
- [89] M. Lam, N. L. Oleinick, A. L. Nieminen, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47379-47386.
- [90] A. Verma, S. L. Facchina, D. J. Hirsch, S. Y. Song, L. F. Dillahey, J. R. Williams, S. H. Snyder, *Mol. Med.* **1998**, *4*, 40-45.
- [91] R. Chaloupka, P. X. Petit, N. Israël, F. Sureau, *FEBS Lett.* **1999**, *462*, 295-301.
- [92] D. Kessel, Y. Luo, P. Mathieu, J. J. Reiners, *Photochem. Photobiol.* **2000**, *71*, 196-200.
- [93] R. Ishisaka, T. Utsumi, M. Yabuki, T. Kanno, T. Furuno, M. Inoue, K. Utsumi, *FEBS Lett.* **1998**, *435*, 233-236.
- [94] J. J. Reiners, J. A. Caruso, P. Mathieu, B. Chelladurai, X.-M. Yin, D. Kessel, *Cell Death Differ.* **2002**, *9*, 934-944.
- [95] M. L. Agarwal, H. E. Larkin, S. I. Zaidi, H. Mukhtar, N. L. Oleinick, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 5897-5902.
- [96] S. Zhuang, M. C. Lynch, I. E. Kochevar, *Exp. Cell Res.* **1999**, *250*, 203-212.
- [97] P. Agostinis, E. Buytaert, H. Breyssens, N. Hendrickx, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 721-729.
- [98] C. A. Robertson, D. H. Evans, H. Abrahamse, *J. Photochem. Photobiol. B.* **2009**, *96*, 1-8.
- [99] A. P. Castano, P. Mroz, M. R. Hamblin, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 535-545.
- [100] A. D. Garg, D. Nowis, J. Golab, P. Agostinis, *Apoptosis* **2010**, *15*, 1050-1071.
- [101] G. Canti, D. Lattuada, A. Nicolini, P. Taroni, G. Valentini, R. Cubeddu, *Anticancer. Drugs* **1994**, *5*, 443-447.
- [102] E. Panzarini, V. Inguscio, L. Dini, *Biomed Res. Int.* **2013**, *2013*, 482160.
- [103] S. W. Ryter, C. J. Gomer, *Photochem. Photobiol.* **1993**, *58*, 753-756.
- [104] E. Kabingu, L. Vaughan, B. Owczarczak, K. D. Ramsey, S. O. Gollnick, *Br. J. Cancer* **2007**, *96*, 1839-1848.
- [105] P. S. Thong, K. Ong, N. S. Goh, K. Kho, V. Manivasager, R. Bhuvaneswari, M. Olivo, K.-C. Soo, *Lancet Oncol.* **2007**, *8*, 950-952.
- [106] C. J. Gomer, S. W. Ryter, A. Ferrario, N. Rucker, S. Wong, A. M. Fisher, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 2355-2360.
- [107] S. O. Gollnick, E. Kabingu, P. C. Kousis, B. W. Henderson, *Proc. SPIE* **2004**, *5319*, 60-70.

- [108] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 889-905.
- [109] R. Bhuvaneswari, Y. Y. Gan, K. C. Soo, M. Olivo, *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 2275-2283.
- [110] A. Weiss, H. Van den Bergh, A. W. Griffioen, P. Nowak-Sliwinska, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1826*, 53-70.
- [111] Z. Guo, P. J. Sadler, *Angew. Chemie* **1999**, *111*, 1610-1630.
- [112] H. Bregman, D. S. Williams, G. E. Atilla, P. J. Carroll, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13594-13595.
- [113] A. Wilbuer, D. H. Vlecken, D. J. Schmitz, K. Kräling, K. Harms, C. P. Bagowski, E. Meggers, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 3839-3842.
- [114] L. Feng, Y. Geisselbrecht, S. Blanck, A. Wilbuer, G. E. Atilla-Gokcumen, P. Filippakopoulos, K. Kräling, M. A. Celik, K. Harms, J. Maksimoska, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5976-5986.
- [115] S. Dieckmann, R. Riedel, K. Harms, E. Meggers, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 813-821.
- [116] E. Meggers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 287-292.
- [117] J. C. Koziar, D. O. Cowan, *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11*, 334-341.
- [118] C. Musewald, G. Hartwich, F. Pöllinger-Dammer, H. Lossau, H. Scheer, M. E. Michel-Beyerle, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8336-8342.
- [119] D. M. Guldi, T. D. Mody, N. N. Gerasimchuk, D. Magda, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8289-8298.
- [120] U. Schatzschneider, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, *2010*, 1451-1467.
- [121] L. Zayat, M. G. Noval, J. Campi, C. I. Calero, D. J. Calvo, R. Etchenique, *Chembiochem* **2007**, *8*, 2035-2038.
- [122] N. A. Kratochwil, M. Zabel, K. J. Range, P. J. Bednarski, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2499-2507.
- [123] N. A. Kratochwil, J. A. Parkinson, P. J. Bednarski, P. J. Sadler, *Angew. Chemie Int. Ed.* **1999**, *38*, 1460-1463.
- [124] P. Müller, B. Schröder, J. A. Parkinson, N. A. Kratochwil, R. A. Coxall, A. Parkin, S. Parsons, P. J. Sadler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 335-339.
- [125] F. S. Mackay, J. A. Woods, P. Heringová, J. Kaspárková, A. M. Pizarro, S. A. Moggach, S. Parsons, V. Brabec, P. J. Sadler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 20743-20748.
- [126] H. Bregman, D. S. Williams, E. Meggers, *Synthesis* **2005**, 1521-1527.

- [127] J. E. Debreczeni, A. N. Bullock, G. E. Atilla, D. S. Williams, H. Bregman, S. Knapp, E. Meggers, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 1580-1585.
- [128] G. E. Atilla-Gokcumen, D. S. Williams, H. Bregman, N. Pagano, E. Meggers, *Chembiochem* **2006**, *7*, 1443-1450.
- [129] J. Maksimoska, L. Feng, K. Harms, C. Yi, J. Kissil, R. Marmorstein, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15764-15765.
- [130] A. Wilbuer, D. H. Vlecken, D. J. Schmitz, K. Kräling, K. Harms, C. P. Bagowski, E. Meggers, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 3839-3842.
- [131] A. Kastl, Masterarbeit - Photoreaktive organometallische Verbindungen als mögliche Chemotherapeutika in der Krebstherapie, Philipps-Universität Marburg, **2010**.
- [132] D. Ren, N. F. Villeneuve, T. Jiang, T. Wu, A. Lau, H. A. Toppin, D. D. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 1433-1438.
- [133] N. M. Niemi, N. J. Lanning, J. A. Klomp, S. W. Tait, Y. Xu, K. J. Dykema, L. O. Murphy, L. A. Gaither, H. E. Xu, K. A. Furge, et al., *Mol. Cell. Biol.* **2011**, *31*, 1357-1368.
- [134] J. Moan, E. O. Pettersen, T. Christensen, *Br. J. Cancer* **1979**, *39*, 398-407.
- [135] J. D. Lane, V. J. Allan, P. G. Woodman, *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 4059-4071.
- [136] J. Huot, F. Houle, S. Rousseau, R. G. Deschesnes, G. M. Shah, J. Landry, *J. Cell Biol.* **1998**, *143*, 1361-1373.
- [137] J. C. Mills, N. L. Stone, J. Erhardt, R. N. Pittman, *J. Cell Biol.* **1998**, *140*, 627-636.
- [138] I. Kraljić, S. El Mohsni, *Photochem. Photobiol.* **1978**, *28*, 577-581.
- [139] K. Wähler, Dissertation - Entwicklung metallorganischer Verbindungen für die Verwendung in der Krebstherapie, Philipps-Universität Marburg, **2014**.
- [140] J. Chaudière, R. Ferrari-Iliou, *Food Chem. Toxicol.* **1999**, *37*, 949-962.
- [141] G. R. Buettner, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *300*, 535-543.
- [142] M. G. Traber, J. F. Stevens, *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 1000-1013.
- [143] A. Kastl, A. Wilbuer, A. L. Merkel, L. Feng, P. Di Fazio, M. Ocker, E. Meggers, *Chem. Commun. (Camb)*. **2012**, *48*, 1863-1865.
- [144] S. Dieckmann, Dissertation - Neue Metallkomplexe mit interessanten biologischen Eigenschaften, Philipps-Universität Marburg, **2012**.
- [145] C. Riccardi, I. Nicoletti, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1458-1461.
- [146] M. O. Hengartner, *Nature* **2000**, *407*, 770-776.

- [147] V. Viswanath, Y. Wu, R. Boonplueang, S. Chen, F. F. Stevenson, F. Yantiri, L. Yang, M. F. Beal, J. K. Andersen, *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 9519-9528.
- [148] T. Wieder, *Blood* **2001**, *97*, 1378-1387.
- [149] S. M. Chiu, N. L. Oleinick, *Br. J. Cancer* **2001**, *84*, 1099-1106.
- [150] D. Nowis, M. Makowski, T. Stokłosa, M. Legat, T. Issat, J. Gołab, *Acta Biochim. Pol.* **2005**, *52*, 339-352.
- [151] M. Hüttemann, P. Pecina, M. Rainbolt, T. H. Sanderson, V. E. Kagan, L. Samavati, J. W. Doan, I. Lee, *Mitochondrion* **2011**, *11*, 369-381.
- [152] T. Kriska, W. Korytowski, A. W. Girotti, *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *433*, 435-446.
- [153] K. K.-W. Lo, M.-W. Louie, K. Y. Zhang, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2603-2622.
- [154] K. K.-W. Lo, K. Y. Zhang, S. P.-Y. Li, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, *2011*, 3551-3568.
- [155] A. Kastl, S. Dieckmann, K. Wähler, T. Völker, L. Kastl, A. L. Merkel, A. Vultur, B. Shannan, K. Harms, M. Ocker, et al., *ChemMedChem* **2013**, *8*, 924-927.
- [156] A. Wilbuer, Dissertation - Entwicklung eines bifunktionalen Wirkstoffs: Antiangiogenese trifft Photozytotoxizität, Philipps-Universität Marburg, **2012**.
- [157] T. Veikkola, M. Karkkainen, L. Claesson-Welsh, K. Alitalo, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 203-212.
- [158] A.-K. Olsson, A. Dimberg, J. Kreuger, L. Claesson-Welsh, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 359-371.
- [159] J. Folkman, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 273-286.
- [160] W.-D. C. Beecken, A. Fernandez, A. M. Joussen, E.-G. Achilles, E. Flynn, K.-M. Lo, S. D. Gillies, K. Javaherian, J. Folkman, Y. Shing, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2001**, *93*, 382-387.
- [161] M. J. Karkkainen, T. V Petrova, *Oncogene* **2000**, *19*, 5598-5605.
- [162] K. Shimizu, H. Kubo, K. Yamaguchi, K. Kawashima, Y. Ueda, K. Matsuo, M. Awane, Y. Shimahara, A. Takabayashi, Y. Yamaoka, et al., *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 328-333.
- [163] M. Yashiro, O. Shinto, K. Nakamura, M. Tendo, T. Matsuoka, T. Matsuzaki, R. Kaizaki, M. Ohira, A. Miwa, K. Hirakawa, *Br. J. Cancer* **2009**, *101*, 1100-1106.
- [164] A. L. Merkel, Masterarbeit - Characterization of a Novel Iridium Complex. AW234 as a Specific PIM1 Inhibitor, Philipps-Universität Marburg, **2012**.
- [165] S. Kanno, N. Oda, M. Abe, Y. Terai, M. Ito, K. Shitara, K. Tabayashi, M. Shibuya, Y. Sato, *Oncogene* **2000**, *19*, 2138-2146.
- [166] A. M. Bugaj, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 1097-1109.

- [167] H. Bregman, P. J. Carroll, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 877-884.
- [168] A. L. Merkel, E. Meggers, M. Ocker, *Expert Opin. Investig. Drugs* **2012**, *21*, 425-436.
- [169] T. Mochizuki, C. Kitanaka, K. Noguchi, T. Muramatsu, A. Asai, Y. Kuchino, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 18659-18666.
- [170] M. Bachmann, C. Kosan, P. X. Xing, M. Montenarh, I. Hoffmann, T. Mörröy, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38*, 430-443.
- [171] Z. Wang, N. Bhattacharya, P. F. Mixer, W. Wei, J. Sedivy, N. S. Magnuson, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1593*, 45-55.
- [172] T. L. T. Aho, J. Sandholm, K. J. Peltola, H. P. Mankonen, M. Lilly, P. J. Koskinen, *FEBS Lett.* **2004**, *571*, 43-49.
- [173] D. Drygin, M. Haddach, F. Pierre, D. M. Ryckman, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8199-8208.
- [174] J. Chen, M. Kobayashi, S. Darmanin, Y. Qiao, C. Gully, R. Zhao, S. Kondo, H. Wang, H. Wang, S.-C. J. Yeung, et al., *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 400-411.
- [175] C. Lottner, K. Bart, G. Bernhardt, H. Brunner, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2064-2078.
- [176] J. Mao, Y. Zhang, J. Zhu, C. Zhang, Z. Guo, *Chem. Commun. (Camb)*. **2009**, 908-910.
- [177] J. Zhu, Z. Chen, V. Lallemand-Breitenbach, H. de Thé, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 705-713.
- [178] N. R. Panyala, E. M. Peña-Méndez, J. Havel, *J. Appl. Biomed.* **2009**, *7*, 75-91.
- [179] R. C. Taylor, S. P. Cullen, S. J. Martin, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 231-241.
- [180] Y. Liu, R. Hammitt, D. A. Lutterman, L. E. Joyce, R. P. Thummel, C. Turro, *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 375-385.
- [181] X. Zhao, H. Li, R. J. Lee, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 309-319.
- [182] J. J. M. Landry, P. T. Pyl, T. Rausch, T. Zichner, M. M. Tekkedil, A. M. Stütz, A. Jauch, R. S. Aiyar, G. Pau, N. Delhomme, et al., *G3 (Bethesda)*. **2013**, *3*, 1213-1224.
- [183] M. Scheffner, B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, P. M. Howley, *Cell* **1990**, *63*, 1129-1136.
- [184] E. May, J. R. Jenkins, P. May, *Oncogene* **1991**, *6*, 1363-1365.

Abkürzungsverzeichnis

$^1\text{O}_2$	Singulett Sauerstoff
$^3\text{O}_2$	Triplett Sauerstoff
ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Proteinkinase B
ALA	5-Aminolävulinsäure
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> (Protein)
BCR	<i>Breakpoint cluster region</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
B-Raf	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAD	<i>Caspase-activated DNase</i>
Carboxy-DFF	5-(und 6)-Carboxy-2',7'-difluorofluorescein
Carboxy-H ₂ DFFDA	5-(und 6)-Carboxy-2',7'-difluorodihydrofluoresceindiacetat
Cdc25A	<i>Cell division cycle-phosphatase 25A</i>
Cdc25C	<i>Cell division cycle-phosphatase 25C</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CLK2	<i>CDC-like kinase 2</i>
CML	Chronische Myeloische Leukämie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAPK1	<i>Death-associated protein kinase-1</i>
DEVD	Aspartat-Glutamat-Valin-Aspartat
DiOC6	3,3'-Dihexyloxacarbocyanin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMEM	<i>Dolbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dppz	Dipyrido[2,3- a:2,3-c]phenazin
DTT	Dithiothreitol
DYRK1B	<i>Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1B</i>
EC ₅₀	Konzentration der halbmaximalen Wirkung

Abkürzungsverzeichnis

ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	<i>Early endosomal antigen 1</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
Em	<i>Emission</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
Ex	<i>Excitation</i>
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FLT3	<i>Fms-related tyrosine kinase 3</i>
GSK-3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEK-293	<i>Human Embryonic Kidney Cells</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
hERG	<i>Human Ether-a-go-go Related Gen</i>
HIPK2	<i>Homeodomain-interacting protein kinase 2</i>
HpD	Hämatoporphyrin Derivat
HPV	Humane Papillomviren
HSP70	<i>Heat Shock Protein 70</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IC ₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
KSL	Kumulative Spross Länge
LAMP1	<i>Lysosomal associated protein 1</i>
LED	<i>Light-emitting diode</i>
LETD	Leucin-Glutamat-Threonin-Aspartat
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	<i>MAPK/ERK kinase 1</i>
MELK	<i>Maternal embryonic leucine zipper kinase</i>
MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MRT	Magnetresonanztomographie

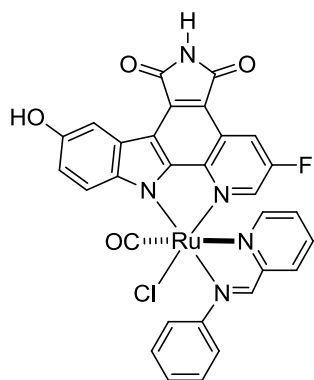
MST2	<i>Mammalian STE20-like protein kinase 2</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NIH3T3	Embryonale Maus Fibroblasten
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>
p21	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
PAK1	<i>p21-activated kinase-1</i>
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PDT	Photodynamische Therapie
phen	Phenanthrolin
PI	Propidiumiodid
PI ₃	Inositol -(1,4,5)-trisphosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Pim1	<i>Serine/threonine-protein kinase pim-1</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PPIX	Protoporphyrin IX
PRKG2	<i>cGMP-dependent protein kinase 2</i>
PS	Photosensibilisator
PTPC	<i>Permeability transition pore complex</i>
PTP	<i>Permeability transition pore</i>
qPCR	<i>Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
R110	Rhodamin 110
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i> (Proteinkinasenfamilie)
RAS	<i>Rat sarcoma</i> (Proto-Onkogen)
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
RFU	<i>Relative fluorescence units</i>
RLU	<i>Relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNO	<i>p</i> -Nitrosodimethylanilin
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Zellkulturmedium)

Abkürzungsverzeichnis

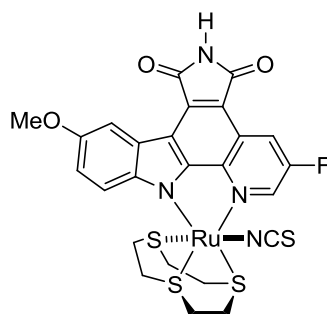
SOD	Superoxid-Dismutase
Src	Tyrosinkinase (Onkogen des <i>Rous sarcoma virus</i>)
TBHP	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
UV-Vis	ultraviolette + sichtbares Licht
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
WGA-TMR	<i>Wheat Germ Agglutinin-Tetramethylrhodamine</i>
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Membranpotential
λ_{\max}	Absorptionsmaximum mit der höchsten Wellenlänge

Strukturverzeichnis

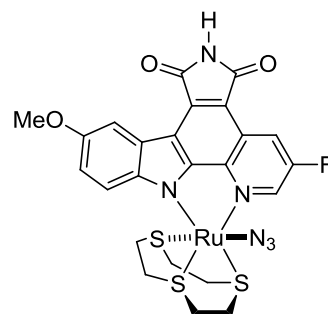
Ruthenium-Komplexe



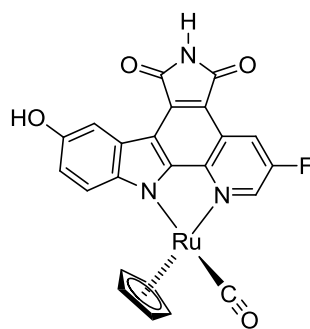
FL-337



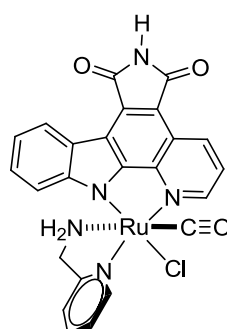
FL-541-1



FL-1055

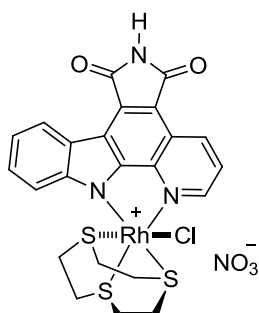


NP309

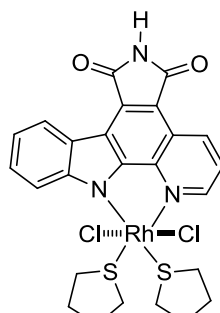


SW010a

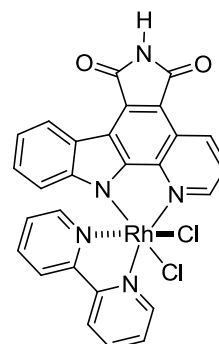
Rhodium-Komplexe



SEK137

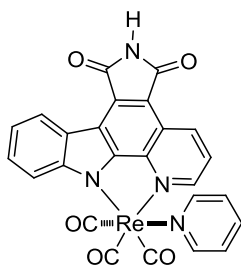


SEK203

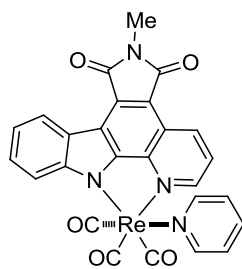


SEK209

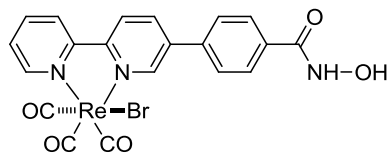
Rhenium-Komplexe



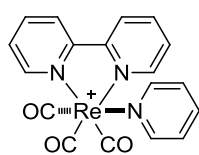
SEK030



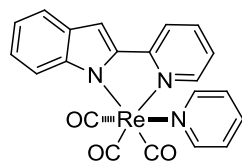
SEK240



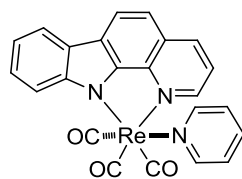
SEK189



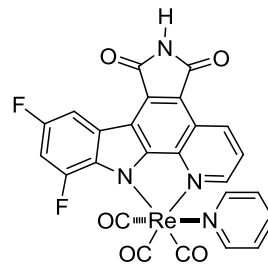
SEK237



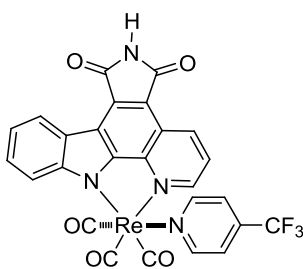
SEK245



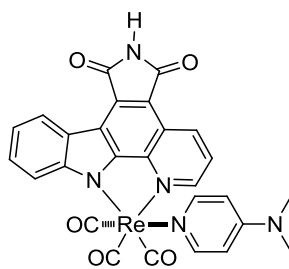
SEK257



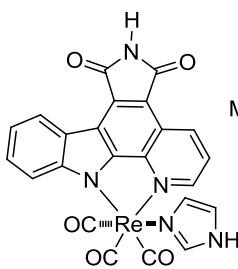
SEK260



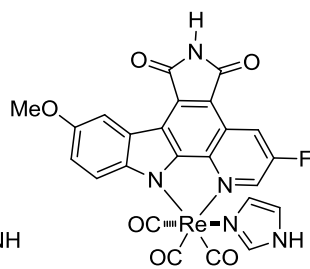
ASSD06



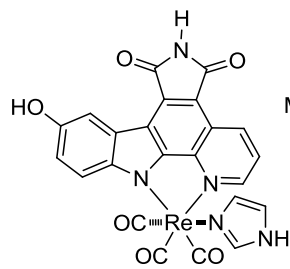
ASSD11



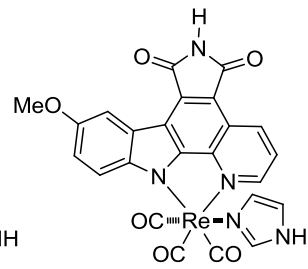
KW164



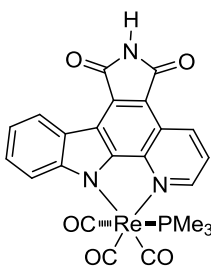
KW224



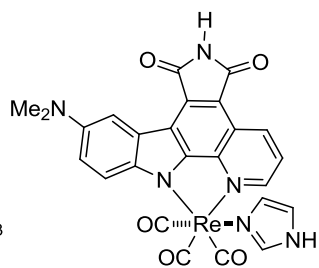
KW263



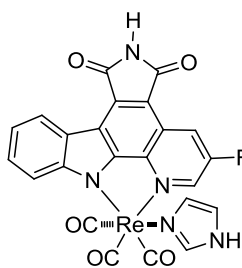
KW264



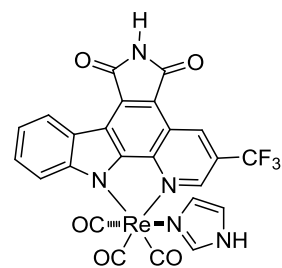
KW297



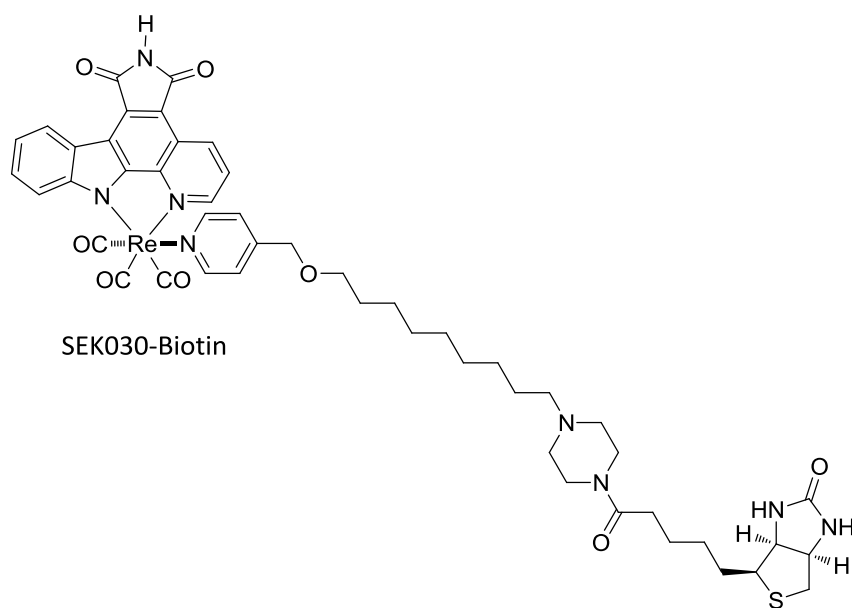
KW315



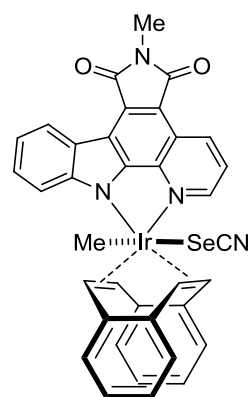
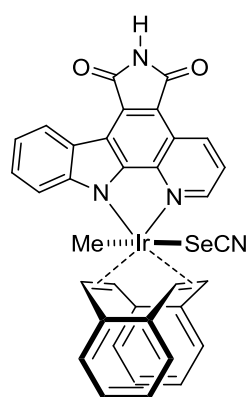
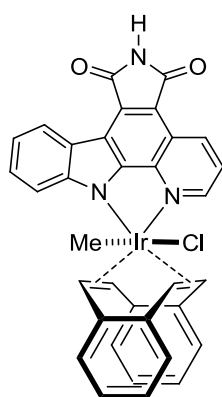
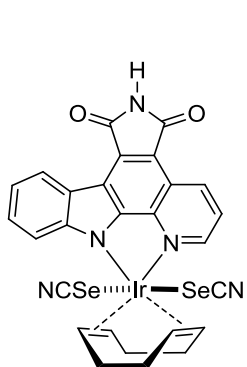
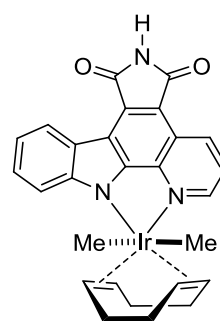
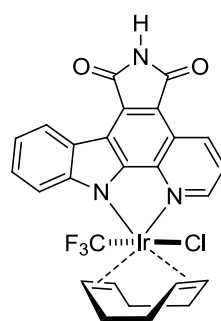
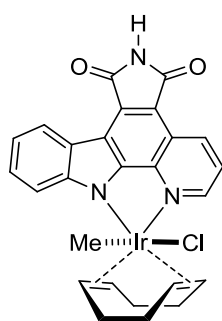
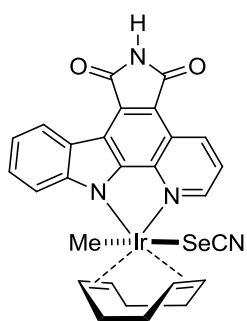
KWPS16



KWPS18



Iridium-Komplexe



Anhang

Zellviabilitäts-Tests

Tabelle 6: Gemessene Zellviabilität aus **Abbildung 17**. Untersuchung verschiedener Ruthenium und Iridium-Komplexe auf eine photozytotoxische Wirkung in HeLa Zellen.

Verbindung	Wellenlänge	Konzentration	Zellviabilität (%) unbelichtet	Zellviabilität (%) 15 min belichtet
FL-337	$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	1 μM	103.43 (± 11.53)	95.64 (± 7.59)
FL-541-1	$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	1 μM	86.41 (± 14.08)	80.97 (± 11.36)
FL-1055	$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	1 μM	66.74 (± 13.62)	69.00 (± 7.71)
NP-309	$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	1 μM	20.92 (± 1.40)	86.86 (± 6.87)
AW0025	$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	1 μM	96.65 (± 10.08)	30.24 (± 17.63)
AW41	$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	1 μM	104.21 (± 14.73)	79.28 (± 4.53)
AW0078	$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	1 μM	104.09 (± 13.12)	81.70 (± 6.41)
AW0101	$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	1 μM	101.38 (± 10.93)	36.38 (± 14.35)
AW0106	$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	1 μM	92.67 (± 11.33)	85.23 (± 7.72)
AW0171	$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	1 μM	105.81 (± 13.38)	32.20 (± 14.26)
AW0234	$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	1 μM	113.23 (± 5.37)	12.54 (± 3.22)

Tabelle 7: Gemessene Zellviabilität aus **Abbildung 18**. Untersuchung verschiedener Rhodium- und Rhenium-Komplexe auf eine photozytotoxische Wirkung in HeLa Zellen.

Verbindung	Wellenlänge	Konzentration	Zellviabilität (%) unbelichtet	Zellviabilität (%) 15 min belichtet
SEK030	$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	1 μM	99.07 (± 9.35)	0.64 (± 0.71)
SEK137	$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	1 μM	97.97 (± 5.99)	101.69 (± 8.02)
SEK189	$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	10 μM	87.93 (± 9.85)	93.00 (± 7.83)
SEK203	$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	1 μM	75.13 (± 5.95)	78.91 (± 5.67)
SEK209	$\lambda \geq 330 \text{ nm}$	10 μM	86.90 (± 10.79)	87.20 (± 11.55)

Tabelle 8: Gemessene Zellviabilität aus **Abbildung 19**. Konzentrations-abhängige Wirkung von AW0234 auf die Zellviabilität kultivierter HeLa-Zellen.

Verbindung	Wellenlänge	Konzentration	Zellviabilität (%) unbelichtet	Zellviabilität (%) 60 min belichtet
AW0234	$\lambda \geq 450$ nm	0.01 μ M	96.92 (\pm 13.30)	103.18 (\pm 7.45)
		0.03 μ M	97.36 (\pm 6.71)	106.23 (\pm 6.24)
		0.1 μ M	92.71 (\pm 11.17)	90.47 (\pm 11.85)
		0.3 μ M	99.95 (\pm 11.59)	35.56 (\pm 9.47)
		1 μ M	101.37 (\pm 16.48)	2.81 (\pm 1.43)
		3 μ M	92.81 (\pm 12.03)	0.25 (\pm 0.33)
		10 μ M	25.47 (\pm 14.22)	0.00 (\pm 0.44)
		30 μ M	4.88 (\pm 1.37)	0.57 (\pm 0.31)

Tabelle 9: Gemessene Zellviabilität aus **Abbildung 19**. Konzentrations-abhängige Wirkung von AW0234 auf die Zellviabilität kultivierter HT29-Zellen.

Verbindung	Wellenlänge	Konzentration	Zellviabilität (%) unbelichtet	Zellviabilität (%) 60 min belichtet
AW0234	$\lambda \geq 450$ nm	0.01 μ M	100.46 (\pm 8.20)	94.48 (\pm 5.32)
		0.03 μ M	99.62 (\pm 10.91)	91.76 (\pm 6.89)
		0.1 μ M	106.71 (\pm 11.55)	85.32 (\pm 6.66)
		0.3 μ M	111.17 (\pm 10.95)	46.01 (\pm 16.49)
		1 μ M	106.79 (\pm 18.43)	14.64 (\pm 4.59)
		3 μ M	99.02 (\pm 13.15)	1.38 (\pm 0.32)
		10 μ M	77.79 (\pm 14.17)	1.27 (\pm 0.46)
		30 μ M	39.60 (\pm 4.76)	2.12 (\pm 0.50)
		100 μ M	46.05 (\pm 3.75)	4.06 (\pm 1.35)

Tabelle 10: Gemessene Zellviabilität aus **Abbildung 19**. Konzentrations-abhängige Wirkung von SEK030 auf die Zellviabilität kultivierter HeLa-Zellen.

Verbindung	Wellenlänge	Konzentration	Zellviabilität (%) unbelichtet	Zellviabilität (%) 60 min belichtet
SEK030	$\lambda \geq 505$ nm	0.01 μM	95.58 (± 10.09)	97.99 (± 9.93)
		0.03 μM	93.37 (± 11.78)	88.03 (± 4.59)
		0.1 μM	101.25 (± 9.74)	57.76 (± 13.07)
		0.3 μM	106.00 (± 10.87)	8.21 (± 4.08)
		1 μM	103.86 (± 10.81)	-0.04 (± 0.47)
		3 μM	111.22 (± 11.59)	1.67 (± 1.30)
		10 μM	118.10 (± 18.03)	1.28 (± 0.77)
		30 μM	83.80 (± 27.09)	2.59 (± 1.22)
		100 μM	54.61 (± 5.64)	1.27 (± 0.77)

Tabelle 11: Gemessene Zellviabilität aus **Abbildung 19**. Konzentrations-abhängige Wirkung von SEK030 auf die Zellviabilität kultivierter HT29-Zellen.

Verbindung	Wellenlänge	Konzentration	Zellviabilität (%) unbelichtet	Zellviabilität (%) 60 min belichtet
SEK030	$\lambda \geq 505$ nm	0.01 μM	105.99 (± 13.48)	93.30 (± 8.12)
		0.03 μM	104.36 (± 15.74)	82.23 (± 4.69)
		0.1 μM	98.06 (± 10.64)	43.27 (± 24.48)
		0.3 μM	106.57 (± 10.39)	2.85 (± 2.76)
		1 μM	98.68 (± 12.77)	0.74 (± 0.25)
		3 μM	99.72 (± 16.92)	0.85 (± 0.26)
		10 μM	75.39 (± 15.65)	1.04 (± 0.28)
		30 μM	43.23 (± 10.17)	1.29 (± 0.91)
		100 μM	43.86 (± 11.23)	2.40 (± 0.24)

Tabelle 12: Gemessene Zellviabilität aus **Abbildung 24**. Inhibierende Wirkung von α -Tocopherol auf den photozytotoxischen Effekt von SEK030 und AW0234 in HeLa-Zellen.

Verbind- ung	Wellenlänge	Konzentration	Konzentration α -Tocopherol	Zellviabilität (%) unbelichtet	Zellviabilität (%) 30 min belichtet
SEK030	$\lambda \geq 505$ nm	1 μ M	/	102.86 (\pm 8.89)	3.81 (\pm 3.81)
			10 μ M	108.87 (\pm 5.85)	5.73 (\pm 6.08)
			50 μ M	104.44 (\pm 6.53)	26.22 (\pm 14.53)
			200 μ M	106.05 (\pm 8.76)	67.11 (\pm 15.65)
			400 μ M	98.74 (\pm 10.51)	75.28 (\pm 5.51)
AW0234	$\lambda \geq 415$ nm	1 μ M	/	115.97 (\pm 10.11)	10.28 (\pm 5.78)
			200 μ M	113.73 (\pm 10.62)	71.59 (\pm 12.81)

Tabelle 13: Gemessene Zellviabilität aus **Abbildung 35c**. Wellenlängen-abhängige photozytotoxische Wirkung der Komplexe SEK237, SEK245, SEK257 und SEK030 nach einer 60-minütigen Belichtung in HeLa-Zellen.

Verbindung	Wellenlänge	Konzentration	Zellviabilität (%)
SEK237	$\lambda \geq 330$ nm	1 μ M	91.20 (\pm 7.72)
	$\lambda \geq 415$ nm		91.44 (\pm 9.02)
	$\lambda \geq 505$ nm		100.03 (\pm 8.59)
	unbelichtet		98.84 (\pm 10.28)
SEK245	$\lambda \geq 330$ nm	1 μ M	5.30 (\pm 1.83)
	$\lambda \geq 415$ nm		1.87 (\pm 1.08)
	$\lambda \geq 505$ nm		89.89 (\pm 7.37)
	unbelichtet		94.89 (\pm 16.02)
SEK257	$\lambda \geq 330$ nm	1 μ M	0.16 (\pm 0.27)
	$\lambda \geq 415$ nm		0.59 (\pm 0.55)
	$\lambda \geq 505$ nm		97.21 (\pm 5.40)
	unbelichtet		100.24 (\pm 12.26)
SEK030	$\lambda \geq 330$ nm	1 μ M	0.64 (\pm 0.71)
	$\lambda \geq 415$ nm		0.07 (\pm 0.60)
	$\lambda \geq 505$ nm		0.00 (\pm 0.47)
	unbelichtet		103.86 (\pm 10.81)

Tabelle 14: Gemessene Zellviabilität aus **Abbildung 36**. Photozytotoxische Wirkung der Komplexe SEK30, ASSD06, ASSD11 und KW164 nach der Belichtung mit einer Xe/Hg-Bogenlampe in HeLa-Zellen. Zusätzlich dargestellt ist die photozytotoxische Wirkung des Phosphin-Komplexes KW297 nach der Belichtung mit einem LED-Reflektor.

Verbindung	Wellenlänge	Konzentration	Zellviabilität (%) unbelichtet	Zellviabilität (%) 60 min belichtet
SEK030	$\lambda \geq 505$ nm	1 μ M	103.86 (\pm 10.81)	0.00 (\pm 0.47)
ASSD06	$\lambda \geq 505$ nm	1 μ M	91.39 (\pm 10.52)	13.33 (\pm 5.69)
ASSD11	$\lambda \geq 505$ nm	1 μ M	115.36 (\pm 10.74)	43.52 (\pm 36.64)
KW164	$\lambda \geq 505$ nm	1 μ M	99.14 (\pm 12.47)	0.88 (\pm 0.83)
KW297	$\lambda \geq 400$ nm	1 μ M	106.57 (\pm 10.81)	0.45 (\pm 0.91)

Tabelle 15: Gemessene Zellviabilität aus **Abbildung 38c**. Wellenlängen-abhängige photozytotoxische Wirkung der Komplexe SEK260, KW164, KWPS16 und KWPS18 nach einer 30-minütigen Belichtung mit einem LED-Reflektor in HeLa-Zellen.

Verbindung	Wellenlänge	Konzentration	Zellviabilität (%)
SEK260	$\lambda \geq 400$ nm	1 μ M	3.12 (\pm 2.67)
	$\lambda \geq 505$ nm		6.23 (\pm 1.31)
	$\lambda \geq 560$ nm		81.33 (\pm 7.53)
	$\lambda \geq 580$ nm		92.09 (\pm 5.41)
	$\lambda \geq 620$ nm		92.91 (\pm 5.29)
	unbelichtet		108.17 (\pm 15.37)
KW164	$\lambda \geq 400$ nm	1 μ M	1.24 (\pm 0.70)
	$\lambda \geq 505$ nm		2.76 (\pm 0.65)
	$\lambda \geq 560$ nm		13.41 (\pm 1.97)
	$\lambda \geq 580$ nm		29.78 (\pm 7.74)
	$\lambda \geq 620$ nm		99.38 (\pm 12.37)
	unbelichtet		96.84 (\pm 9.46)
KWPS16	$\lambda \geq 400$ nm	1 μ M	1.78 (\pm 1.15)
	$\lambda \geq 505$ nm		2.29 (\pm 0.80)
	$\lambda \geq 560$ nm		5.61 (\pm 1.10)
	$\lambda \geq 580$ nm		7.64 (\pm 2.14)
	$\lambda \geq 620$ nm		91.23 (\pm 10.32)
	unbelichtet		103.79 (\pm 11.09)
KWPS18	$\lambda \geq 400$ nm	1 μ M	7.77 (\pm 3.31)
	$\lambda \geq 505$ nm		8.15 (\pm 1.77)
	$\lambda \geq 560$ nm		15.20 (\pm 3.33)
	$\lambda \geq 580$ nm		24.83 (\pm 5.67)
	$\lambda \geq 620$ nm		97.14 (\pm 7.23)
	unbelichtet		101.41 (\pm 10.05)

Tabelle 16: Gemessene Zellviabilität aus **Abbildung 39**. Photozytotoxische Wirkung der Komplexe KW164, KWPS16 KWPS18 und KW224 nach einer 60-minütigen Belichtung mit $\lambda \geq 620$ nm in HeLa-Zellen.

Verbindung	Wellenlänge	Konzentration	Zellviabilität (%) unbelichtet	Zellviabilität (%) 60 min belichtet
KW164	$\lambda \geq 620$ nm	5 μ M	95.17 (\pm 5.99)	46.48 (\pm 4.87)
KWPS16	$\lambda \geq 620$ nm	5 μ M	92.71 (\pm 11.13)	10.47 (\pm 1.59)
KWPS18	$\lambda \geq 620$ nm	5 μ M	96.06 (\pm 8.56)	28.03 (\pm 3.25)
KW224	$\lambda \geq 620$ nm	5 μ M	94.92 (\pm 10.42)	20.44 (\pm 3.51)

Tabelle 17: Gemessene Zellviabilität aus **Abbildung 40**. Konzentrations-abhängige Wirkung von KWPS16 auf die Zellviabilität kultivierter HeLa-Zellen mit und ohne Belichtung.

Verbindung	Wellenlänge	Konzentration	Zellviabilität (%) unbelichtet	Zellviabilität (%) 30 min belichtet
KWPS16	$\lambda \geq 580$ nm	0.01 μ M	102.10 (\pm 8.65)	94.57 (\pm 7.27)
		0.1 μ M	97.99 (\pm 6.70)	92.29 (\pm 5.10)
		0.3 μ M	99.54 (\pm 5.59)	53.25 (\pm 6.35)
		1 μ M	100.76 (\pm 6.29)	9.25 (\pm 1.93)
		3 μ M	94.61 (\pm 7.37)	1.28 (\pm 0.42)
		10 μ M	51.22 (\pm 12.22)	1.03 (\pm 0.38)
		100 μ M	3.25 (\pm 1.48)	0.84 (\pm 0.84)

Tabelle 18: Konzentrations-abhängige Wirkung von SEK030 auf die Zellviabilität kultivierter HeLa-Zellen. Im Gegensatz zu den anderen durchgeführten Konzentrations-abhängigen Messungen wurde in diesem Fall das Medium mit dem gelösten Komplex vor der Belichtung aus den *wells* entfernt und gegen frisches Medium ohne Komplex ausgetauscht.

Verbindung	Wellenlänge	Konzentration	Zellviabilität (%) unbelichtet	Zellviabilität (%) 60 min belichtet
SEK030	$\lambda \geq 505$ nm	0.03 μ M	92.76 (\pm 16.52)	105.86 (\pm 5.08)
		0.1 μ M	97.45 (\pm 11.72)	82.22 (\pm 9.26)
		0.3 μ M	100.74 (\pm 16.57)	29.84 (\pm 10.05)
		1 μ M	97.27 (\pm 15.71)	2.77 (\pm 1.57)
		30 μ M	90.54 (\pm 11.04)	0.02 (\pm 0.22)
		100 μ M	81.84 (\pm 12.80)	-0.38 (\pm 0.37)

xCELLigence-Messungen

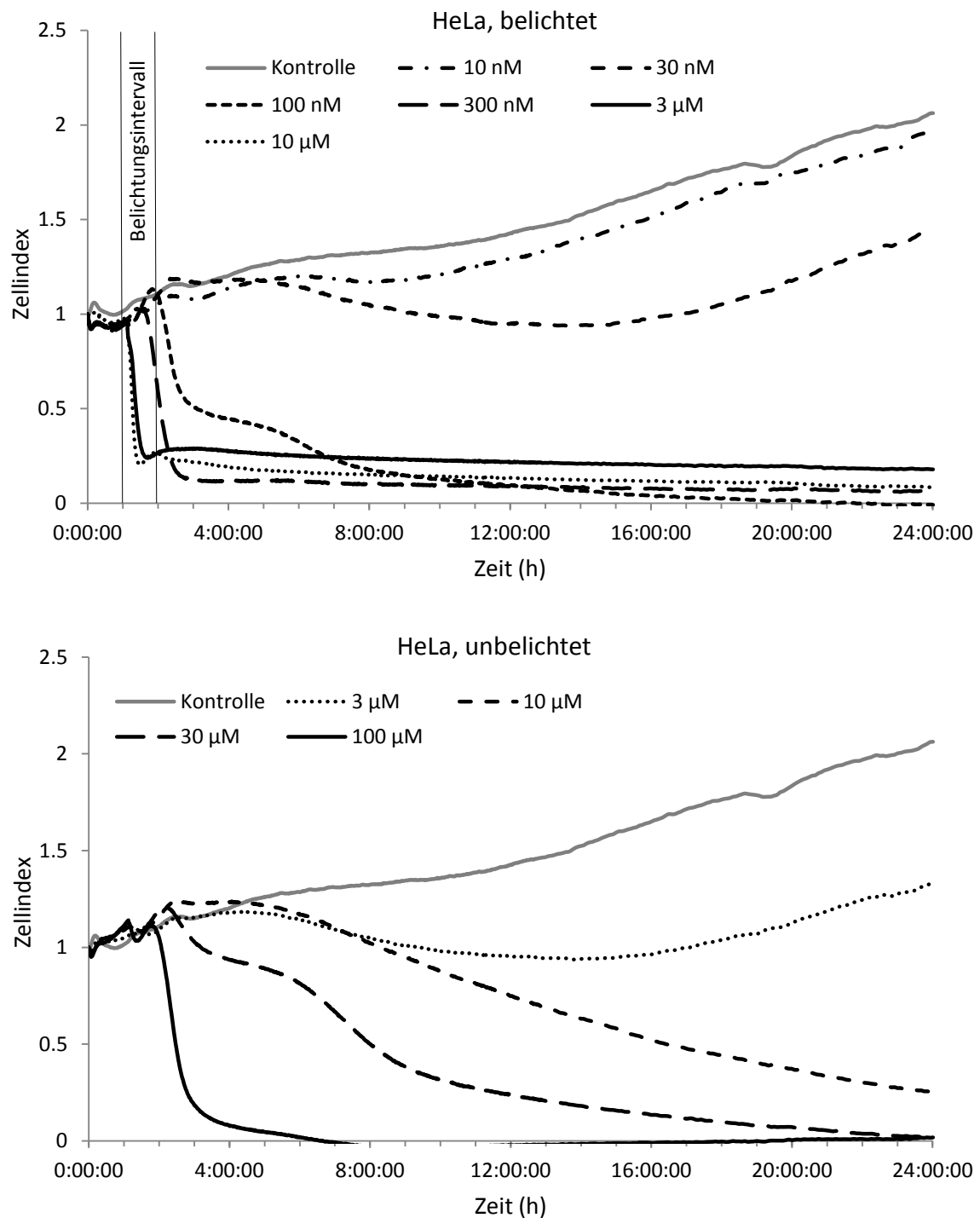


Abbildung 51: Bestimmung der Zellviabilität in Echtzeit mit Hilfe des xCELLigence Systems. HeLa-Zellen wurden in speziellen 96-well Mikrotiterplatten (*E-Plates*) ausgesät und für 24 h inkubiert. Zum Zeitpunkt null wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Komplexes SEK030 behandelt und ein Teil von ihnen wurde 1 h später mit einer LED-Lampe belichtet. Der gemessene Zellindex wurde vor Beginn der Datenaufzeichnung normiert und die Werte von je zwei unabhängigen wells gemittelt.

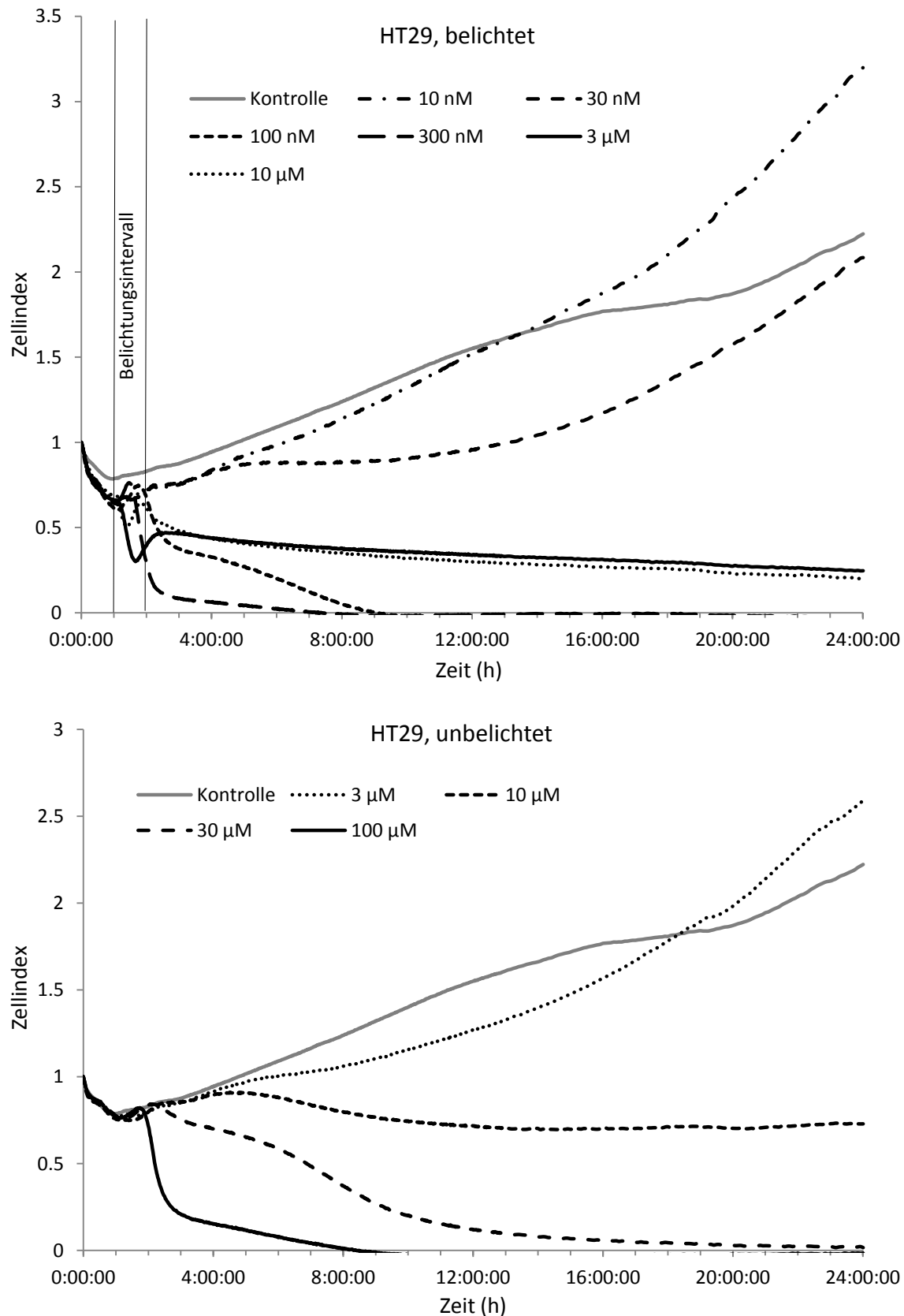


Abbildung 52: Bestimmung der Zellviabilität in Echtzeit mit Hilfe des *xCELLigence* Systems. HT29-Zellen wurden in speziellen 96-well Mikrotiterplatten (*E-Plates*) ausgesät und für 24 h inkubiert. Zum Zeitpunkt null wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Komplexes SEK030 behandelt und ein Teil von ihnen wurde 1 h später mit einer LED-Lampe belichtet. Der gemessene Zellindex wurde vor Beginn der Datenaufzeichnung normiert und die Werte von je zwei unabhängigen *wells* gemittelt.

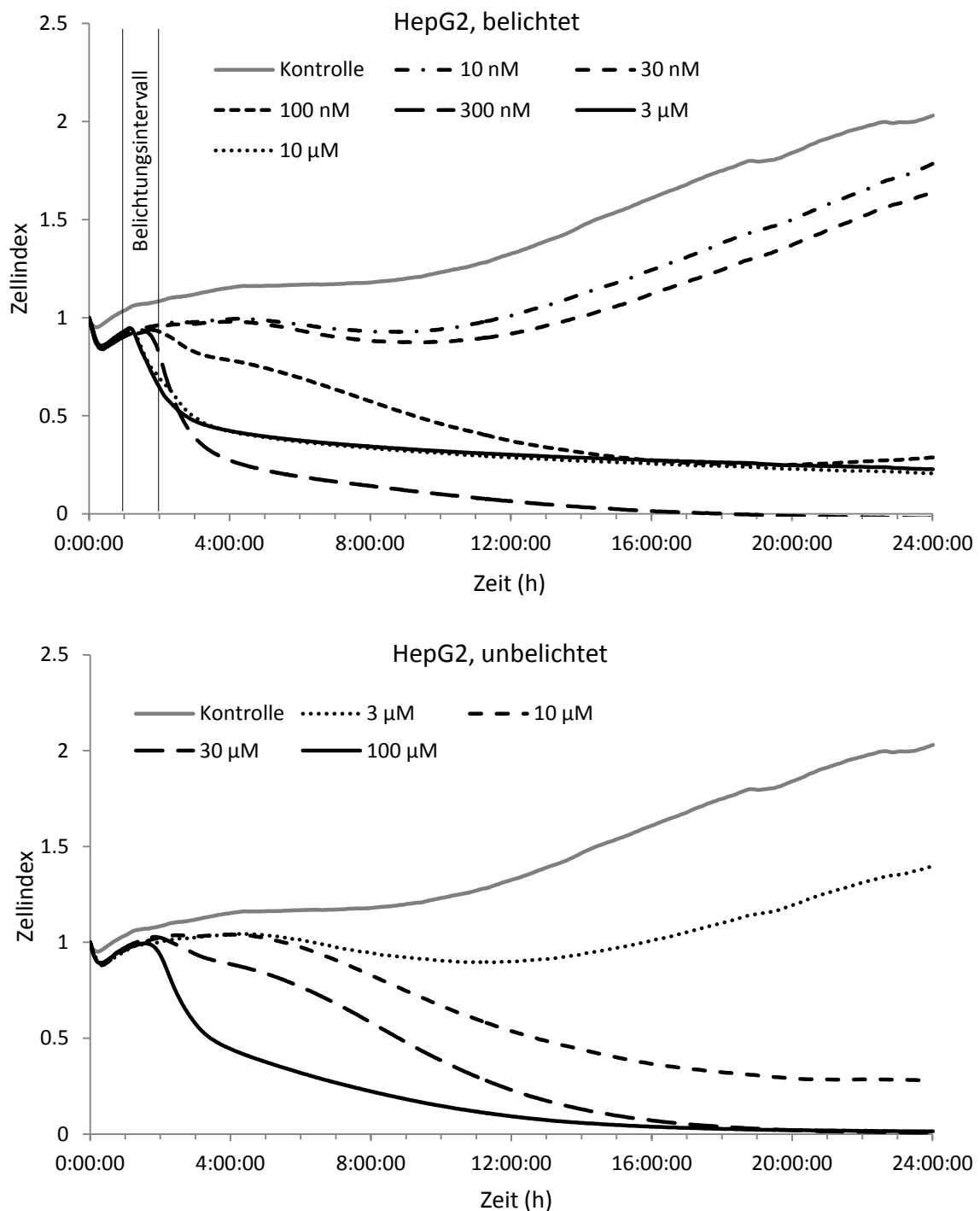


Abbildung 53: Bestimmung der Zellviabilität in Echtzeit mit Hilfe des *xCELLigence* Systems. HepG2-Zellen wurden in speziellen 96-well Mikrotiterplatten (*E-Plates*) ausgesät und für 24 h inkubiert. Zum Zeitpunkt null wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Komplexes SEK030 behandelt und ein Teil von ihnen wurde 1 h später mit einer LED-Lampe belichtet. Der gemessene Zellindex wurde vor Beginn der Datenaufzeichnung normiert und die Werte von je zwei unabhängigen *wells* gemittelt.

Singulett Sauerstoff Nachweis

Tabelle 19: Nachweis der $^1\text{O}_2$ -Produktion aus **Abbildung 23**. Die relative $^1\text{O}_2$ -Produktion durch die Komplexe SEK030 und AW0234 ($50\ \mu\text{M}$) wurde mit RNO ($50\ \mu\text{M}$) und Imidazol ($8\ \text{mM}$) in PBS/DMSO 1:1 nach einer 30-minütigen Belichtung mit einer Xe/Hg Bogenlampe bestimmt. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert aus zwei unabhängigen Dreifachbestimmungen sowie die zugehörige Standardbestimmung.

Verbindung	Wellenlänge	rel. $^1\text{O}_2$ Produktion unbelichtet	rel. $^1\text{O}_2$ Produktion 30 min belichtet
SEK030	$\lambda \geq 505\ \text{nm}$	-0.011 (± 0.017)	0.047 (± 0.011)
AW0234	$\lambda \geq 505\ \text{nm}$	0.010 (± 0.007)	0.089 (± 0.005)

Tabelle 20: Nachweis der Wellenlängen-abhängigen $^1\text{O}_2$ -Produktion aus **Abbildung 35b**. Die relative $^1\text{O}_2$ -Produktion durch die Komplexe SEK237, SEK0245, SEK257 und SEK030 ($50\ \mu\text{M}$) wurde mit RNO ($50\ \mu\text{M}$) und Imidazol ($8\ \text{mM}$) in PBS/DMSO 1:1 nach einer 30-minütigen Belichtung mit einer Xe/Hg Bogenlampe bestimmt. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert aus zwei unabhängigen Dreifachbestimmungen sowie die zugehörige Standardbestimmung.

Verbindung	Wellenlänge	rel. $^1\text{O}_2$ Produktion
SEK237	$\lambda \geq 330\ \text{nm}$	0.071 (± 0.025)
SEK237	$\lambda \geq 415\ \text{nm}$	0.004 (± 0.004)
SEK237	$\lambda \geq 505\ \text{nm}$	0.000 (± 0.019)
SEK237	unbelichtet	-0.015 (± 0.009)
SEK245	$\lambda \geq 330\ \text{nm}$	0.075 (± 0.019)
SEK245	$\lambda \geq 415\ \text{nm}$	0.036 (± 0.003)
SEK245	$\lambda \geq 505\ \text{nm}$	0.010 (± 0.015)
SEK245	unbelichtet	-0.011 (± 0.007)
SEK257	$\lambda \geq 330\ \text{nm}$	0.279 (± 0.040)
SEK257	$\lambda \geq 415\ \text{nm}$	0.137 (± 0.025)
SEK257	$\lambda \geq 505\ \text{nm}$	0.011 (± 0.018)
SEK257	unbelichtet	-0.008 (± 0.009)
SEK030	$\lambda \geq 330\ \text{nm}$	0.074 (± 0.009)
SEK030	$\lambda \geq 415\ \text{nm}$	0.049 (± 0.010)
SEK030	$\lambda \geq 505\ \text{nm}$	0.047 (± 0.011)
SEK030	unbelichtet	-0.011 (± 0.017)

Tabelle 21: Nachweis der Wellenlängen-abhängigen $^1\text{O}_2$ -Produktion aus **Abbildung 38b**. Die relative $^1\text{O}_2$ -Produktion durch die Komplexe SEK260, KW164, KWPS16 und KWPS18 (50 μM) wurde mit RNO (50 μM) und Imidazol (8 mM) in PBS/DMSO 1:1 nach einer 30-minütigen Belichtung mit einem LED-Reflektor bestimmt. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert aus zwei unabhängigen Dreifachbestimmungen sowie die zugehörige Standardbestimmung.

Verbindung	Wellenlänge	rel. $^1\text{O}_2$ Produktion
SEK260	$\lambda \geq 400 \text{ nm}$	0.043 (± 0.011)
SEK260	$\lambda \geq 505 \text{ nm}$	0.027 (± 0.007)
SEK260	$\lambda \geq 560 \text{ nm}$	0.005 (± 0.009)
SEK260	$\lambda \geq 580 \text{ nm}$	-0.005 (± 0.006)
SEK260	$\lambda \geq 620 \text{ nm}$	-0.001 (± 0.007)
SEK260	unbelichtet	-0.002 (± 0.003)
KW164	$\lambda \geq 400 \text{ nm}$	0.029 (± 0.005)
KW164	$\lambda \geq 505 \text{ nm}$	0.028 (± 0.006)
KW164	$\lambda \geq 560 \text{ nm}$	0.010 (± 0.005)
KW164	$\lambda \geq 580 \text{ nm}$	0.003 (± 0.002)
KW164	$\lambda \geq 620 \text{ nm}$	-0.001 (± 0.008)
KW164	unbelichtet	-0.012 (± 0.006)
KWPS16	$\lambda \geq 400 \text{ nm}$	0.036 (± 0.007)
KWPS16	$\lambda \geq 505 \text{ nm}$	0.026 (± 0.005)
KWPS16	$\lambda \geq 560 \text{ nm}$	0.018 (± 0.002)
KWPS16	$\lambda \geq 580 \text{ nm}$	0.009 (± 0.003)
KWPS16	$\lambda \geq 620 \text{ nm}$	-0.002 (± 0.002)
KWPS16	unbelichtet	-0.005 (± 0.007)
KWPS18	$\lambda \geq 400 \text{ nm}$	0.038 (± 0.006)
KWPS18	$\lambda \geq 505 \text{ nm}$	0.036 (± 0.005)
KWPS18	$\lambda \geq 560 \text{ nm}$	0.028 (± 0.007)
KWPS18	$\lambda \geq 580 \text{ nm}$	0.014 (± 0.006)
KWPS18	$\lambda \geq 620 \text{ nm}$	-0.011 (± 0.013)
KWPS18	unbelichtet	0.002 (± 0.004)

Tabelle 22: Relative $^1\text{O}_2$ -Produktion durch die Komplexe KW164, KWPS16, KWPS18 und KW224 ($50\ \mu\text{M}$) während einer 60-minütigen Belichtung mit einem LED-Reflektor ($\lambda \geq 620\ \text{nm}$). Der Nachweis wurde mit $50\ \mu\text{M}$ RNO und Imidazol $8\ \text{mM}$ in PBS/DMSO 1:1 durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert aus zwei unabhängigen Dreifachbestimmungen sowie die zugehörige Standardbestimmung.

Verbindung	Wellenlänge	rel. $^1\text{O}_2$ Produktion unbelichtet	rel. $^1\text{O}_2$ Produktion 60 min belichtet
KW164	$\lambda \geq 620\ \text{nm}$	-0.002 (± 0.003)	-0.002 (± 0.007)
KWPS16	$\lambda \geq 620\ \text{nm}$	-0.005 (± 0.008)	0.009 (± 0.001)
KWPS18	$\lambda \geq 620\ \text{nm}$	-0.004 (± 0.011)	0.015 (± 0.009)
KW224	$\lambda \geq 620\ \text{nm}$	-0.014 (± 0.011)	0.004 (± 0.005)

Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies

Tabelle 23: Nachweis intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies aus **Abbildung 25**. Vor der Behandlung mit SEK030 wurden HeLa-Zellen für 1 h mit dem Nachweisreagens Carboxy- H_2DFFDA inkubiert und danach der gewohnten Phototherapie durch den Komplex und eine Belichtung mit $\lambda \geq 505\ \text{nm}$ für 45 min unterzogen. Direkt im Anschluss an die Belichtung wurde das Fluoreszenzsignal des entstandenen Carboxy-DFF gemessen. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich die Reaktion der Zellen auf $200\ \mu\text{M}$ *tert*-Butylhydroperoxid gemessen. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.

	belichtet	Gemessene Fluoreszenz (RFU)	Standardabweichung
1 % DMSO	-	7.14	± 1.14
1 μM SEK030	-	8.20	± 1.92
30 μM SEK030	-	3.33	± 0.52
1 % DMSO	+	10.17	± 2.19
1 μM SEK030	+	12.07	± 0.93
30 μM SEK030	+	46.41	± 3.36
200 μM TBHP	-	97.08	± 26.06

Nachweis aktiver Caspasen

Tabelle 24: Nachweis der Aktivität der Caspasen 3 und 7 aus **Abbildung 27**. Die mit 1 μM SEK030 behandelten HeLa-Zellen wurden für 1 h im Dunkeln inkubiert und anschließend für 30 min mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 505 \text{ nm}$) belichtet. 5 h nach der Belichtung wurden die Zellen mit dem Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Nachweisreagens behandelt. Die Zellen der Positivkontrolle wurden für 5 h mit 1 μM des Apoptose-induzierenden Kinaseinhibitors Staurosporin inkubiert. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten.

	belichtet	Gemessene Fluoreszenz (RFU)	Standardabweichung
1 % DMSO	-	335.6	± 87.7
1 μM SEK030	-	337.6	± 75.7
1 μM SEK030	+	1914.7	± 530.3
1 μM Staurosporin	-	2200.4	± 413.8

Tabelle 25: Nachweis der Aktivität der Caspase 8 sowie der Caspasen 3 und 7 aus **Abbildung 28**. Die mit 1 μM SEK030 behandelten HeLa-Zellen wurden für 1 h im Dunkeln inkubiert und anschließend für 30 min mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 505 \text{ nm}$) belichtet. 0, 1, 2.5, und 5 h nach der Belichtung wurde die Inkubation durch die Zugabe des Caspase-Glo Nachweisreagens abgebrochen und die Caspaseaktivität durch die Messung der Lumineszenz bestimmt. Die Ergebnisse der Caspase 8 basieren auf sechs Datenpunkten aus zwei unabhängigen Messungen, die Ergebnisse der Caspasen 3 und 7 auf drei unabhängigen Messungen.

Caspase 8

	belichtet	Inkubation nach Belichtung	Gemessene Lumineszenz (RLU)	Standardabweichung
1 % DMSO	-	-	333.6	± 76.0
1 % DMSO	+	5 h	455.2	± 54.0
1 μM SEK030	+	0 h	245.1	± 66.2
1 μM SEK030	+	1 h	426.5	± 76.3
1 μM SEK030	+	2.5 h	715.6	± 406.8
1 μM SEK030	+	5 h	992.0	± 411.1

Caspasen 3 und 7

	belichtet	Inkubation nach Belichtung	Gemessene Lumineszenz (RLU)	Standardabweichung
1 % DMSO	-	-	1697.1	± 340.6
1 % DMSO	+	5 h	2006.7	± 163.2
1 μM SEK030	+	0 h	4278.6	± 364.9
1 μM SEK030	+	1 h	5084.3	± 1027.6
1 μM SEK030	+	2.5 h	3268.4	± 1190.5
1 μM SEK030	+	5 h	7357.9	± 1713.8

IC₅₀-Bestimmung

Tabelle 26: IC₅₀-Bestimmung des Komplexes SEK030 für die Proteinkinase Pim1 aus **Abbildung 42**. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte bei gleichzeitiger Anwesenheit von 100 µM ATP. Die belichteten Proben wurden während der Inkubation des Komplexes mit der Kinase und ihrem Substrat mit einer Xe/Hg-Bogenlampe ($\lambda \geq 450$ nm) bestrahlt. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen die gemittelten Werte zwei unabhängig durchgeführter Doppelbestimmungen sowie ihre Standardabweichungen.

Verbindung	Konzentration	Pim1 Aktivität (%)	
		unbelichtet	belichtet
SEK030	0.001 µM	95.94 (± 7.20)	98.52 (± 0.22)
	0.01 µM	92.51 (± 4.13)	99.15 (± 5.75)
	0.1 µM	87.43 (± 2.88)	84.70 (± 2.67)
	1 µM	30.82 (± 14.21)	29.20 (± 13.61)
	10 µM	4.89 (± 1.35)	5.35 (± 1.64)
	100 µM	0.81 (± 0.12)	0.98 (± 0.18)

Spektren der eingesetzten Lampen

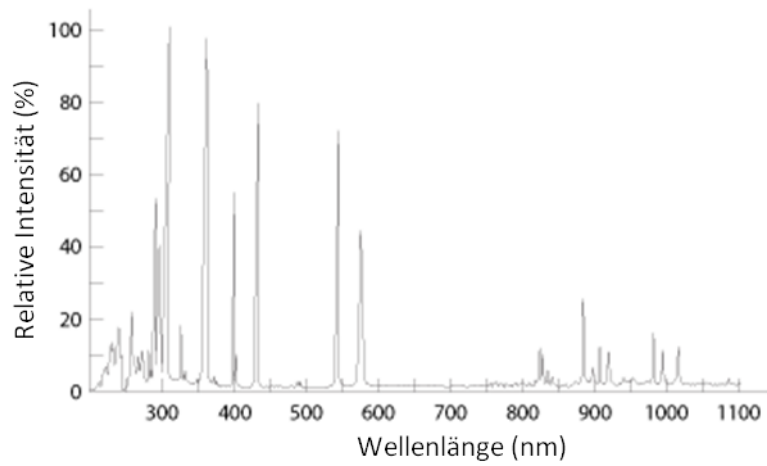


Abbildung 54: Spektrum der Xe/Hg-Bogenlampe (UXM-200HO 200 W).

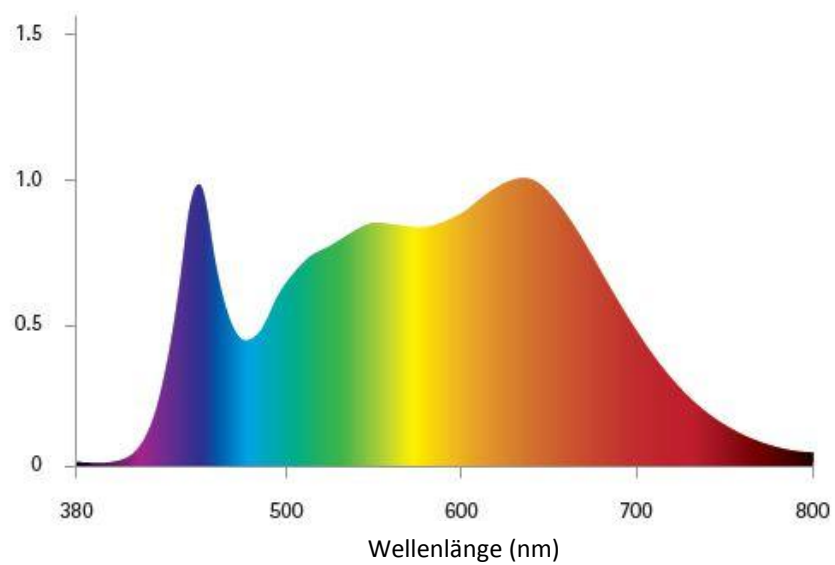


Abbildung 55: Spektrum des 7 W LED-Reflektors von Megaman.